

Einfluss der HIV-Infektion und der antiretroviralen
Therapie auf das mitochondriale Membranpotential
von peripheren mononukleären Blutzellen

Mathias Schmid

Meinen Eltern

Aus der Medizinischen Poliklinik-Innenstadt der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Komm. Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

Einfluss der HIV-Infektion und der antiretroviralen
Therapie auf das mitochondriale Membranpotential
von peripheren mononukleären Blutzellen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Mathias Schmid
aus München
Jahr
2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. F.-D. Goebel
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. E. Meinel Priv. Doz. Dr. med. M. Subklewe
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. T. Sternfeld
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser
Tag der mündlichen Prüfung:	13.11.2008

INHALTSVERZEICHNIS	Seite
I. Einleitung	1
1. HIV-Infektion.....	1
1.1 Definition.....	1
1.2 Epidemiologie und Übertragungswege	1
1.3 Struktur des HI-Virus.....	2
1.4 Genomorganisation des HI-Virus	3
1.5 Replikationszyklus des HI-Virus	4
1.6 Pathogenese und klinische Manifestation	5
2. Therapie der HIV-Infektion	6
3. Antiretroviral wirkende Medikamente	8
3.1 Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren.....	8
3.2 Nukleotidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren	10
3.3 Nicht-Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren	10
3.4 Proteaseinhibitoren.....	10
3.5 Entryinhibitoren.....	10
4. Mitochondrium.....	11
4.1 Aufbau des Mitochondriums	11
4.2 Funktion und Bedeutung des Mitochondriums.....	13
5. Mitochondriale Schädigungen durch die HIV-Infektion.....	15
6. Mitochondriale Schädigungen bei der Therapie mit Nukleosidischen Reverse- Transkriptase-Inhibitoren.....	15
7. Klinisches Spektrum der mitochondrialen Funktionsstörung.....	18
7.1 Periphere Polyneuropathie.....	18
7.2 Lipodystrophie	19
7.3 Hepatotoxizität.....	19
7.4 Myopathie.....	20
7.5 Hyperlaktatämie und Laktatazidose.....	20
7.6 Weitere klinische Manifestationen mitochondrialer Funktionsstörungen.....	21
8. Auswirkungen einer HIV-Infektion und einer antiretroviralen Therapie auf die Mitochondrien von peripheren mononukleären Blutzellen	21

8.1	Periphere mononukleäre Blutzellen als Untersuchungsobjekt.....	21
8.2	Auswirkung einer HIV-Infektion auf die Mitochondrien von peripheren mononukleären Blutzellen	22
8.3	Auswirkungen einer antiretroviralen Therapie auf die Mitochondrien von peripheren mononukleären Blutzellen.....	23
9.	Therapieansätze zur Verminderung mitochondrialer Schädigungen.....	24
10.	Fragestellung und Zielsetzung	26
II.	Material und Methoden	28
1.	Material	28
1.1	Geräte.....	28
1.2	Verbrauchsmaterial.....	28
1.3	Chemikalien und Reagenzien.....	29
1.4	Software	29
2.	Methoden.....	30
2.1	Gewinnung von peripheren mononukleären Blutzellen aus Vollblut	30
2.1.1	Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll	30
2.1.2	Durchführung der Ficoll-Präparation.....	31
2.2	Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials mit dem JC-1-Assay.....	31
2.2.1	Grundlagen des JC-1-Assays.....	31
2.2.2	Durchführung der JC-1-Färbung	33
2.3	Zelluntersuchungen mit der Durchflusszytometrie	33
2.3.1	Theoretische Grundlagen der Durchflusszytometrie	33
2.3.2	Durchführung der Durchflusszytometrie	34
2.4	Auswertung der Durchflusszytometrie.....	34
2.5	Statistische Auswertung.....	36
III.	Ergebnisse	37
1.	Charakterisierung der Studienteilnehmer.....	37
2.	Gruppen I bis III und mitochondriales Membranpotential.....	41
3.	Laborwerte und mitochondriales Membranpotential.....	43
3.1	CD4-Zellzahl und mitochondriales Membranpotential	43
3.2	CD4-Nadir und mitochondriales Membranpotential.....	45
3.3	Viruslast und mitochondriales Membranpotential	47

3.4	Laktat-Wert und mitochondriales Membranpotential	49
4.	Antiretrovirale Therapie und mitochondriales Membranpotential.....	49
5.	Infektionsdauer und mitochondriales Membranpotential	51
6.	Lipodystrophie, periphere Polyneuropathie und mitochondriales Membranpotential.....	51
7.	Chronische Hepatitis C-Infektion und mitochondriales Membranpotential	52
8.	Geschlecht und mitochondriales Membranpotential	52
9.	Multivariate Analyse	53
10.	Kurzzeittherapie und mitochondriales Membranpotential.....	54
11.	Triacetyluridin und mitochondriales Membranpotential	58
12.	Reproduzierbarkeit des JC-1-Assays zur Messung des mitochondrialen Membranpotentials	60
IV.	Diskussion.....	63
1.	HIV-Infektion und mitochondriales Membranpotential.....	63
2.	HIV-infizierte, antiretroviral therapierte Patienten und mitochondriales Membranpotential.....	66
3.	Infektionsdauer und mitochondriales Membranpotential	69
4.	Lipodystrophie, periphere Polyneuropathie und mitochondriales Membranpotential.....	70
5.	Geschlecht und mitochondriales Membranpotential	72
6.	Kurzzeittherapie und mitochondriales Membranpotential.....	73
7.	Triacetyluridin und mitochondriales Membranpotential	75
V.	Zusammenfassung und Ausblick	77
VI.	Abkürzungsverzeichnis	80
VII.	Abbildungsverzeichnis	82
VIII.	Tabellenverzeichnis.....	84
IX.	Literaturverzeichnis.....	85
X.	Danksagung	94
XI.	Publikationen	95
XII.	Lebenslauf	97

I. Einleitung

1. HIV-Infektion

1.1 Definition

Die HIV-Infektion wird durch das humane Immunschwächevirus (HIV, human immunodeficiency virus) verursacht. Das HI-Virus führt nach einer Latenzperiode im klinischen Endzustand der Infektion zum erworbenen Immunschwäche-Syndrom (AIDS, acquired immunodeficiency syndrome).

1.2 Epidemiologie und Übertragungswege

Das HI-Virus-1 wurde erstmals im Jahr 1983 am Institut Pasteur in Paris aus einem Lymphknoten eines Patienten mit Lymphadenopathie isoliert (Barre-Sinoussi et al. 1983). Kurz darauf entdeckten Wissenschaftler an den National Institutes of Health der USA ein humanes T-Zell-lymphotropes Virus, das mit dem HI-Virus-1 identisch war (Gallo et al. 1983). Im Jahr 1986 wurde das HI-Virus-2 isoliert, das gegenüber dem HI-Virus-1 eine reduzierte Pathogenität aufweist und fast ausschließlich in Westafrika vorkommt (Clavel et al. 1986).

Die Infektion mit dem HI-Virus hat in den letzten Jahren pandemische Ausmaße angenommen und weltweit die Malaria als häufigste durch eine Infektion bedingte Todesursache abgelöst. Über 95 % der HIV-Neuinfektionen treten in den Entwicklungsländern auf (UNAIDS 2007). In Deutschland sind nach Schätzung des Robert Koch-Instituts ca. 59000 Menschen HIV-infiziert, weltweit sind es ca. 33 Millionen. Die Zahl der Neuinfektionen wurde für das Jahr 2007 mit ungefähr 3000 angegeben und nimmt leicht zu (RKI 2007).

Epidemiologisch wichtig ist die Übertragung des HI-Virus durch sexuellen Kontakt mit einem infizierten Partner, durch kontaminierte Blutprodukte, wenn diese nicht auf HIV getestet wurden, durch das needle sharing intravenös Drogenabhängiger und die vertikale Übertragung des Virus durch die HIV-infizierte Mutter auf ihr Kind.

Obwohl in den letzten zwei Jahrzehnten wesentliche Fortschritte bei der medizinischen Behandlung dieser weltweit verbreiteten und lebensbedrohenden Viruserkrankung erzielt wurden, besteht immer noch großer Forschungsbedarf, um das Zusammenwirken von Virus und Wirtsorganismus weiter aufzuklären.

1.3 Struktur des HI-Virus

HIV-1 und HIV-2 zeigen im Elektronenmikroskop die morphologischen Charakteristika eines Lentivirus mit einer Virushülle und einem konisch geformten inneren Anteil (virus core). Beide Virus-Typen unterscheiden sich lediglich hinsichtlich der Molekülmassen ihrer Proteine und der Anordnung der Regulatorgene. Das HIV-Partikel besitzt einen Durchmesser von etwa 100 nm. Es wird durch eine äußere Hülle aus Lipoproteinen begrenzt, die humane Membrankomponenten enthält. In die Hülle ist das Glykoprotein gp41 eingelagert. Daran sind 72 knopfartige Strukturen gebunden, die aus Trimeren oder Tetrameren des Glykoproteins gp120 gebildet werden. Die Bindung ist nicht kovalent, so dass das Glykoprotein spontan freigesetzt werden kann. Dieser Vorgang wird als shedding bezeichnet. An der Innenseite der Virushülle befindet sich das Matrixprotein p17. Das Kapsid-Antigen besteht aus etwa 2500 Molekülen des Proteins p24 und umschließt den inneren Anteil des Virus. Darin befinden zwei identische HIV-RNA-Moleküle. An diese sind jeweils das Nukleoprotein p7 und die Reverse Transkriptase gebunden. Räumlich eng assoziiert liegen noch weitere Enzyme wie die Integrase und die Protease vor, die ebenfalls für die Replikation des Virus wichtig sind (Schedel 2004; Rubbert 2005) (Abbildung 1).

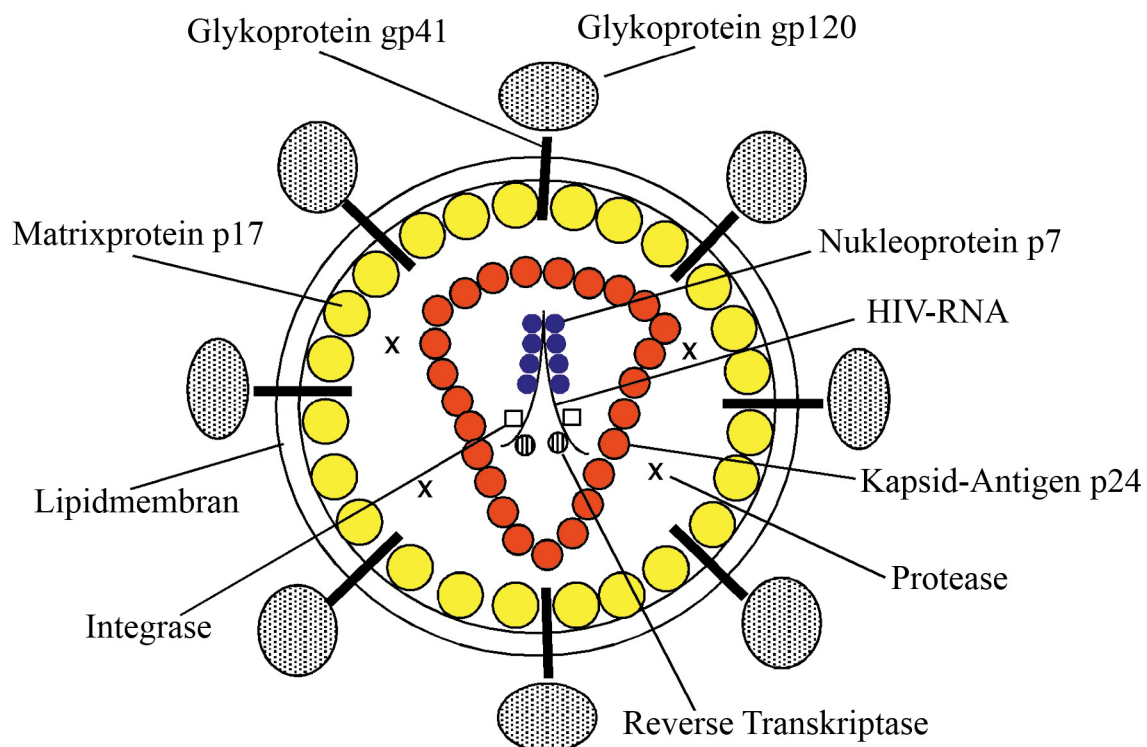


Abbildung 1: Struktur des HIV-1 (verändert nach Freed 1998)

1.4 Genomorganisation des HI-Virus

Im Genom des HI-Virus liegt das allgemein für Retroviren typische Aufbauschema 5'LTR-gag-pol-env-3'LTR vor. Die beiden Enden des Genoms werden von zwei LTR (long terminal repeat)-Fragmenten gebildet, die bei der Integration beidseitig kovalent mit der zellulären DNA verbunden werden. An das 5'LTR-Fragment schließen sich die Gene gag (group-antigene) und pol (polymerase) an. Das gag-Gen kodiert innere Strukturproteine wie das Matrixprotein p17, das Kapsidprotein p24 und das Nukleoprotein p7. Das pol-Gen ist für die Bildung der viralen Enzyme wie Reverse Transkriptase, Protease und Integrase zuständig. Auf diese Gene folgt das vif (virion infectivity factor)-Gen, dann überlappende Gene für die regulatorischen Proteine Vpr (virion protein), Tat (transcriptional transactivator), Rev (posttranscriptional activator) und Vpu (virion protein u). Das sich daran anschließende env (envelope)-Gen kodiert die Glykoproteine gp120 und gp41 der Virushülle. Nun folgen das nef (negative effector)-Gen und das Fragment 3'LTR, das den Abschluss des Genoms bildet (Frankel und Young 1998; Goebel et al. 2000) (Abbildung 2).

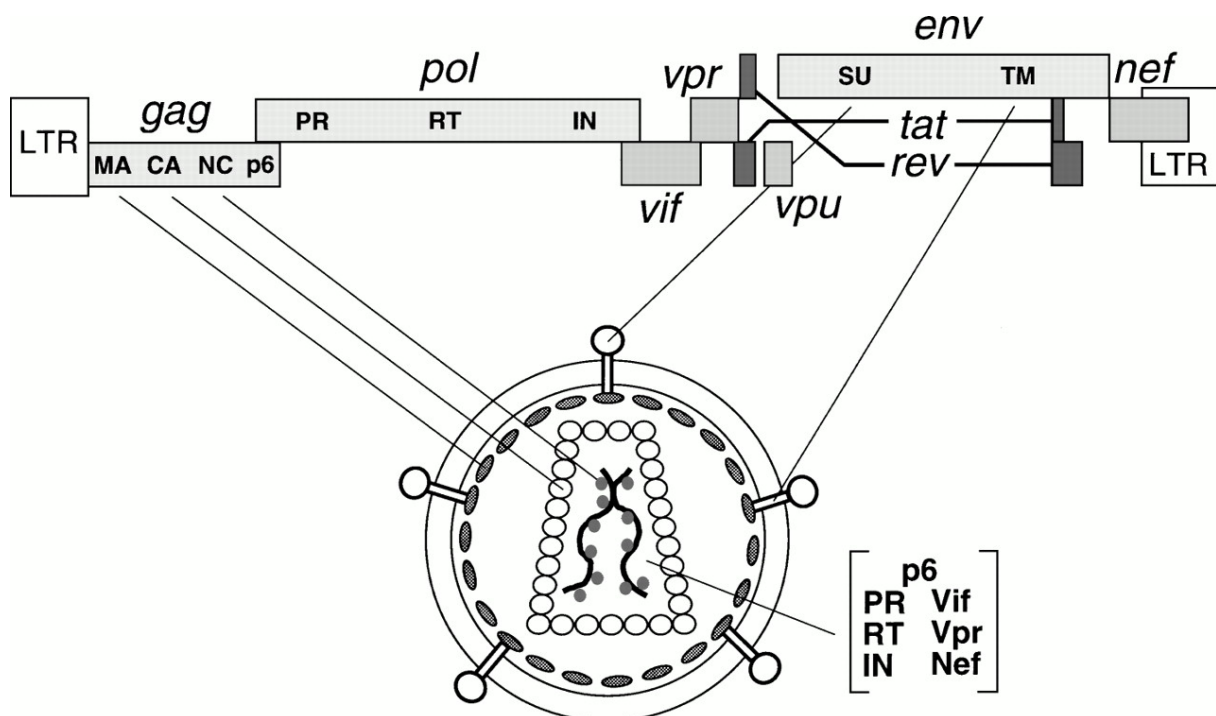


Abbildung 2: Genomorganisation des HIV-1 (Frankel und Young 1998)

1.5 Replikationszyklus des HI-Virus

Voraussetzung für die Replikation des HI-Virus ist die erfolgreiche Interaktion des Virus mit Rezeptoren an der Oberfläche der Wirtszellen. Einer der wichtigsten Rezeptoren ist das Glykoprotein CD4, das sich auf T-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, eosinophilen Granulozyten, dendritischen Zellen und Gliazellen befindet. Das Glykoprotein gp120 der Virushülle wird an bestimmte Bereiche des CD4-Rezeptors gebunden. Dieser Kontakt von Virushülle und zellulärem Rezeptor CD4 reicht jedoch für einen erfolgreichen Eintritt des Virus nicht aus und muss deshalb durch weitere Proteine der Zelloberfläche, so genannte Korezeptoren, unterstützt werden. Als Korezeptoren wirken vor allem Chemokinrezeptoren (Schedel 2004).

Makrophagotrope HI-Viren lagern sich über den CD4-Rezeptor und den Chemokinrezeptor 5 (CCR-5) an die Zellmembran an, mehr T-lymphotrope HI-Viren über den Chemokinrezeptor 4 (CCR-4 oder CXCR-4) (Goebel et al. 2000).

Aus dem Protein gp120, dem CD4-Rezeptor und dem Korezeptor entsteht ein Komplex, der eine Konformationsänderung des Proteins gp41 bewirkt. Dies führt zu einer Interaktion von gp41 mit einem Fusionsrezeptor an der Zelle. Anschließend fusioniert die HIV-Hülle mit der Zellmembran (Schedel 2004). Durch dieses Abstreifen der Membran, uncoating genannt, gelangt das virale Kapsid in das Cytoplasma der infizierten Zelle. Innerhalb des Kapsids beginnt die Umschreibung der viralen RNA durch die mitgebrachten Enzymaktivitäten Reverse Transkriptase und RNase H in eine lineare DNA-Kopie. Der synthetisierte HIV-DNA-Doppelstrang mit anhängender Integrase wird nach Aktivierung der CD4-Zelle in den Zellkern transportiert und durch das virale Enzym Integrase in das menschliche Genom integriert. In vivo kann eine derartige Aktivierung des Immunsystems durch einen Antigenkontakt oder im Rahmen einer opportunistischen Infektion auftreten. Bis zu fünf HIV-Genome können in einer humanen DNA integriert sein (Goebel et al. 2000; Rubbert 2005).

Neben Monozyten, Makrophagen und Zellen des zentralen Nervensystems können latent infizierte ruhende CD4-Zellen, die nicht integrierte DNA enthalten, als langlebiges Virusreservoir angesehen werden (Chun et al. 1997).

Zelluläre Transkriptionsfaktoren binden im Zellkern an die LTR-Region der HIV-DNA und initiieren und fördern dadurch die Transkription von HIV-Genen. Bei der Replikation des HI-Virus wird erst die mRNA für die Regulatorproteine Tat, Rev und Nef transkribiert,

dann die mRNA für die Gag-Proteine und das Gag-Pol-Fusionsprotein, welches von der Protease gespalten wird. Die Produkte der HIV-Gene pol und gag formieren den Kern des reifenden HIV-Partikels, die env-Genprodukte bilden die Glykoproteine gp120 und gp41 der Virushülle.

Das Virusgenom und virale Proteine formieren sich schrittweise zum Viruskern, der sich Richtung Zellmembran bewegt. Bei der anschließenden Ausknospung, budding genannt, werden die gebildeten Viruskapside von einer aus der Wirtszelle stammenden Lipidmembran umhüllt und als neue infektiöse Viruspartikel freigesetzt. In einem HIV-infizierten Patienten können 10^9 bis 10^{11} Viruspartikel pro Tag gebildet werden (Schedel 2004; Rubbert 2005).

1.6 Pathogenese und klinische Manifestation

Die HIV-induzierte Pathogenität beruht auf der progressiven Depletion von T-Helfer-Lymphozyten im peripheren Blut. Die persistierende Infektion dieser CD4-Zellen stellt die zentrale Reaktion für die Entwicklung des HIV-induzierten Immundefektes und für die Entstehung der klinischen Symptomatik dar.

Nach der HIV-Infektion verbreitet sich das Virus innerhalb von 1 - 2 Wochen im gesamten Organismus. Innerhalb von ca. 6 Wochen kommt es zu einer ausgeprägten Plasmavirämie (Gürtler 2004). Die quantitative Bestimmung der Konzentration der HIV-RNA im Plasma der Patienten, die Plasmaviruslast, ist zur Diagnose der akuten HIV-Erkrankung von großer Bedeutung, da diese mit der Prognose über den Verlauf der Krankheit in den folgenden 10 Jahren statistisch assoziiert ist. Patienten mit einer hohen Viruslast haben im Rahmen der akuten HIV-Infektion eine schlechtere Prognose als Patienten mit einer geringeren Viruslast. Nach einigen Tagen nimmt die Virämie aufgrund einer Immunantwort gegen das HI-Virus wieder ab, da es zur Produktion von spezifischen Antikörpern gegen verschiedene Determinanten des Virus kommt, die das Virus inaktivieren. Antikörper gegen das Virus können in den meisten Fällen 4 - 6 Wochen nach einer HIV-Infektion mit Routinetestsystemen wie den ELISA-Test mit Bestätigung im Western-Blot nachgewiesen werden. Die zelluläre Immunantwort wird von CD8-zytotoxischen T-Lymphozyten repräsentiert, die virusinfizierte Zellen erkennen und eliminieren können. CD8-Zellen sind im peripheren Blut von Patienten im Stadium des akuten HIV-Syndroms und im asymptomatischen Stadium der HIV-Infektion in normaler oder erhöhter Zahl nachweisbar.

Bei ca. 50 - 90 % der HIV-infizierten Patienten tritt 2 - 6 Wochen nach der Infektion ein individuell gestaltetes Krankheitsbild auf, das einer akuten Mononukleose oder einem grippalen Infekt ähnlich ist. Die häufigsten Symptome dieses so genannten akuten HIV-Syndroms sind unspezifisch: Fieber, Müdigkeit, Kopfschmerzen, Pharyngitis, kleinfleckiges Exanthem, Lymphknotenschwellungen und gastrointestinale Symptome.

Nach dem spontanen Abklingen der Symptome der akuten HIV-Krankheit befindet sich der Patient im Stadium der klinischen Latenz. Der Patient ist weitgehend asymptomatisch und in der Regel bei Wohlbefinden und leistungsfähig. Obwohl zytotoxische T-Zellen und HIV-Antikörper die HIV-Produktion einschränken, kommt es in dieser Phase dennoch zu einem mehr oder weniger kontinuierlichen Abfall der CD4-Zellzahl im peripheren Blut. Gleichzeitig steigt die Konzentration der HIV-RNA im Plasma an (Goebel 2004a; Schedel 2004).

Bei nahezu allen Patienten treten nach 5 - 10 Jahren HIV-assoziierte Symptome einer klinisch apparenten HIV-Erkrankung auf. In diesem Stadium ist die Produktion von HIV-Viren massiv, da immunologische, gegen die HIV-Replikation gerichtete Mechanismen nur noch begrenzt wirksam sind. Es kann ein Abfall der CD4-Zellen im peripheren Blut unter den Normbereich bis hin zur völligen Depletion beobachtet werden. Der fortschreitende CD4-Zellverlust führt zu AIDS definierenden Erkrankungen und damit zum Vollbild von AIDS. Dazu gehören opportunistische Infektionen, die durch Bakterien, Viren, Pilze oder Protozoen hervorgerufen werden. Zusätzlich kommt es zur HIV-Enzephalopathie, zum Wasting-Syndrom und zu HIV-assoziierten Malignomen wie Kaposi-Sarkom, Non-Hodgkin-Lymphom und invasives Zervixkarzinom (Goebel 2004a).

Der klinische Verlauf zeigt, dass das menschliche Immunsystem das HI-Virus nicht definitiv eliminieren kann, auch wenn asymptomatische Verläufe von mehr als 20 Jahren vorkommen (Gürtler 2004). Man spricht bei einem Überleben von mehr als 8 - 10 Jahren ohne CD4-Zellverlust von long-term-non-progressors (LTNP) (Goebel et al. 2000).

2. Therapie der HIV-Infektion

Bei der HIV-Infektion muss wie bei allen Infektionskrankheiten die spezifische Therapie gegen den Erreger selbst gerichtet sein. Wichtige Grundlagen für den Beginn und das Monitoring einer antiretroviralen Therapie sind neben dem klinischen Zustand des Patienten die CD4-Zellzahl und die HI-Viruslast (HIV-RNA-Kopien/ml) im Plasma. Ziel

einer antiretroviralen Therapie ist die maximale Suppression der Virusneubildung und damit eine Reduktion der Viruslast im peripheren Blut. Eine Reihe von Studien ergab, dass die Verringerung der Viruslast die Progression der Krankheit verzögert, die Überlebenszeit verlängert und die Lebensqualität verbessert (Goebel et al. 2000). Da auch in der klinischen Latenzphase der HIV-Infektion eine hohe Virusreplikation stattfindet, scheint eine konsequente Therapie zu einem frühen Zeitpunkt der HIV-Infektion angebracht zu sein. Eine eindeutige Therapieindikation besteht bei Patienten mit HIV-assoziierten Symptomen sowie bei asymptomatischen Patienten mit einer CD4-Zellzahl unter 200 Zellen/ μ l. Bei asymptomatischen Patienten mit einer CD4-Zellzahl von 200 bis 350 Zellen/ μ l ist der Beginn einer Therapie ratsam. Bei entsprechend hoher Viruslast kann auch bei einer CD4-Zellzahl über 350 Zellen/ μ l eine antiretrovirale Therapie sinnvoll sein (Arastéh K 2005). Eine antiretrovirale Therapie sollte prinzipiell lebenslang erfolgen, da Untersuchungen ergaben, dass eine Beendigung der antiretroviralen Therapie zur Zunahme der Virusreplikation mit den entsprechenden klinischen Folgen führt. Mit den derzeitigen Therapiemöglichkeiten ist eine Eradikation des Virus und damit eine Heilung nicht möglich. Infolge der hohen Fehlerrate der viralen Reversen Transkriptase werden ständig Virusmutanten gebildet. Durch die antiretrovirale Therapie können resistente Mutanten selektiert werden, die sich auch unter der antiretroviralen Therapie replizieren und weitere Zellen infizieren. Eine weitestgehende Unterdrückung der Virusreplikation führt demzufolge auch zu einer deutlichen Verzögerung der Resistenzentwicklung (Goebel 2004b).

Mit der europäisch-australischen Delta-Studie und der amerikanischen Studie ACTG-175 (AIDS Clinical Trials Group) wurde die therapeutische Überlegenheit einer Kombinationsbehandlung gegenüber einer Monotherapie nachgewiesen. Derzeit gilt als Therapiestandard eine Dreifachkombination aus zwei verschiedenen Nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI) und einem Proteaseinhibitor (PI) bzw. einem Nicht-Nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitor (NNRTI) oder einem dritten NRTI mit hoher In-vivo-Wirksamkeit. Mit der Einführung von Proteaseinhibitoren vor einigen Jahren steht eine hoch aktive antiretrovirale Therapie (HAART, highly active antiretroviral therapy) zur Verfügung.

Mit dem Einsatz der HAART ist die Zahl der AIDS-Neuerkrankungen in den Industrieländern deutlich zurückgegangen. Therapierte Patienten leben auch im AIDS-Stadium länger (Preiser und Doerr 2004). Antiretrovirale Medikamente sind jedoch teuer

und führen oft zu unerwünschten Nebenwirkungen, so dass das Risiko, an AIDS zu erkranken, gegen das Risiko einer Resistenzentwicklung und das Auftreten von Nebenwirkungen einer Langzeittherapie abgewogen werden muss (Goebel 2004b).

3. Antiretroviral wirkende Medikamente

Zur Therapie stehen derzeit 23 antiretrovirale Einzelsubstanzen zur Verfügung, die sich in vier Wirkstoffklassen einteilen lassen: Nukleosidische und Nukleotidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI und NtRTI), Nicht-Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTI), Proteaseinhibitoren (PI) und seit dem Jahr 2003 die so genannten Fusionsinhibitoren.

Die heute zugelassenen Substanzen haben mit Ausnahme der Fusionsinhibitoren die Hemmung von zwei Schlüsselenzymen zum Ziel. NRTIs, NtRTIs und NNRTIs hemmen die für die Replikation benötigte Reverse Transkriptase, PIs hemmen die für die Reifung der viralen Proteine zuständige Protease. Fusionsinhibitoren hindern das HI-Virus am Eintritt in die Wirtszelle.

3.1 Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren

Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI) sind Didesoxynukleoside, die nach Aufnahme in die Zelle durch zelluläre Enzyme triphosphoryliert und dadurch in ihre aktive Form, die Didesoxynukleosid-Triphosphate (dNTP), gebracht werden.

Die Triphosphate konkurrieren als „falsche Bausteine“ mit den in der Zelle vorhandenen Triphosphaten um die Bindung an die Reverse Transkriptase und hemmen diese kompetitiv. Außerdem bewirkt die Modifikation an der 3'-OH-Gruppe der Desoxyribose beim Einbau der NRTIs anstelle der entsprechenden natürlichen Nukleoside in die provirale DNA einen Kettenabbruch, da bei der Synthese der proviralen DNA eine Bindung zur nächsten Base nicht möglich ist (De Clercq 2000).

Zurzeit sind in Deutschland 7 NRTIs zur antiretroviralen Therapie zugelassen (Tabelle 1). Zidovudin (AZT, Retrovir®) wurde 1987 als erste antiretrovirale Substanz zur Therapie der HIV-Infektion zugelassen. Studien zeigten, dass mit einer Zidovudin-Monotherapie im Spätstadium der Erkrankung die Häufigkeit opportunistischer Infektionen und die Mortalität gesenkt werden können (Fischl et al. 1990). Bei Zidovudin ist die 3'-OH-Gruppe von Thymidin durch eine Azido-Gruppe ersetzt. Es wird wie alle anderen NRTIs

intrazellulär triphosphoryliert und nach Abspaltung einer Diphosphatgruppe als 5'-Monophosphat am 3'-Ende der viralen DNA eingebaut (De Clercq 2004).

Das zweite Thymidinanalogon Stavudin (d4T, Zerit[®]) war lange Zeit das am häufigsten eingesetzte antiretrovirale Medikament. Mehrere Studien konnten jedoch die schädigenden Nebenwirkungen dieses Inhibitors, die zum Teil auch auf dessen mitochondrialer Toxizität beruhen, nachweisen (Gallant et al. 2004).

Das einzige zugelassene nukleosidische Adenosinanalogon ist Didanosin (ddI, Videx[®]).

Cytidinanaloga sind Zalcitabin (ddC, Hivid[®]), Lamivudin (3TC, Epivir[®]) und Emtricitabin (FTC, Emtriva[®]). Lamivudin und Emtricitabin können neben der Reversen Transkriptase des HI-Virus auch die Reverse Transkriptase des Hepatitis B-Virus hemmen und werden deshalb auch zur Behandlung einer Hepatitis B-Infektion eingesetzt (Doong et al. 1991). Bei beiden Stoffen ist der 3'-Kohlenstoff der Desoxyribose durch ein Schwefelatom ersetzt. Emtricitabin besitzt an der 5'-Stelle des Cytidins noch ein Fluoratom. Von beiden Substanzen ist jeweils das L-(-)- β -Enantiomer weniger toxisch und höher wirksam als das D-(+)- β -Enantiomer (De Clercq 2004).

Abacavir (ABC, Ziagen[®]) ist das einzig verfügbare Guanosinanalogon. Es wird nach der intrazellulären Phosphorylierung und Desaminierung zu Carbovir (CBV) umgewandelt, welches nach zweifacher Dephosphorylierung als Carbovir-5'-monophosphat in die DNA eingebaut wird.

Natürliches Nukleosid	Nukleosidanalogon	Abkürzung	Handelsname
Adenosin	Didanosin	ddI	Videx [®]
	Zalcitabin	ddC	Hivid [®]
Cytidin	Emtricitabin	FTC	Emtriva [®]
	Lamivudin	3TC	Epivir [®]
Guanosin	Abacavir	ABC	Ziagen [®]
Thymidin	Zidovudin	AZT	Retrovir [®]
	Stavudin	d4T	Zerit [®]

Tabelle 1: Zur Therapie der HIV-Infektion zugelassene Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI) (Stand 2006)

3.2 Nukleotidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren

Nukleotidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NtRTI) besitzen neben der Pentose und der Base noch einen Phosphorsäurerest und sind deshalb Nukleotidanaloga. In Deutschland ist das Adenosinphosphat analogon Tenofovir (TDF, Viread[®]) zur Behandlung der HIV-Infektion zugelassen (Hoffmann 2005). Tenofovir wirkt ähnlich wie die NRTIs und kann deshalb dieser Inhibitorengruppe zugeordnet werden.

3.3 Nicht-Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren

Nicht-Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTI) hemmen im Gegensatz zu den NRTIs die Reverse Transkriptase allosterisch. Sie werden an das Enzym gebunden und bewirken eine Konformationsänderung am aktiven Zentrum. Die Bindungsstelle und das aktive Zentrum sind sowohl räumlich als auch funktionell assoziiert. Durch die kooperative Interaktion dieser beiden Regionen kann die Effektivität von Kombinationstherapien aus NRTIs und NNRTIs gesteigert werden.

1996 wurde als erstes NNRTI Nevirapin (NVP, Viramune[®]) zugelassen. Weitere NNRTIs sind Efavirenz (EFV, Sustiva[®]) und Delavirdin (DLV, Rescriptor[®]) (Hoffmann 2005).

3.4 Proteaseinhibitoren

Proteaseinhibitoren (PI) hemmen aufgrund ihrer Struktur das aktive Zentrum der HIV-Protease kompetitiv und verhindern somit die Reifung des Viruspartikels. Die proteolytische Aufspaltung bzw. die Reifung der Präkursorproteine unterbleibt und es entstehen nicht-infektiöse Viruspartikel (Hoffmann 2005).

PIs sind Saquinavir-Softgel (FTV, Fortovase[®]), Saquinavir-Hardgel (INV, Invirase[®]), Indinavir (IDV, Crixivan[®]), Nelfinavir (NFV, Viracept 625[®]), Lopinavir/Ritonavir (LPV/r, Kaletra[®]), Atazanavir (ATV, Reyataz[®]), Fosamprenavir (FPV, Telzir[®]) und Ritonavir (RTV, Norvir[®]), Tipranavir (TPV, Aptivus[®]) (Stand 2006).

3.5 Entryinhibitoren

Das HI-Virus bindet beim Eintritt in die Zielzelle an drei Schlüsselstellen. Durch so genannte Entryinhibitoren kann diese Bindung verhindert werden.

Attachment-Inhibitoren hemmen die Anlagerung des HI-Virus an den CD4-Rezeptor, Korezeptorantagonisten verhindern die Bindung des HI-Virus an Korezeptoren und Fusionsinhibitoren verhindern die Fusion des Virus mit der Zelle. Der erste

Fusionsinhibitor Enfuvirtid (T-20, Fuzeon[®]), ein aus 36 Aminosäuren bestehendes Polypeptid, wurde in Europa im Mai 2003 zugelassen. Enfuvirtid muss subkutan gespritzt werden. Es bindet an eine Intermediärstruktur von gp41, die bei der Fusion des HI-Virus mit der Zielzelle entsteht (Hoffmann 2005).

4. Mitochondrium

4.1 Aufbau des Mitochondriums

Mitochondrien sind lang gestreckte bis sphärisch-ovoid gestaltete Zellorganellen, die einen Durchmesser von 0,5 - 1 μm und eine Länge von 1 - 4 μm aufweisen (Abbildung 3).

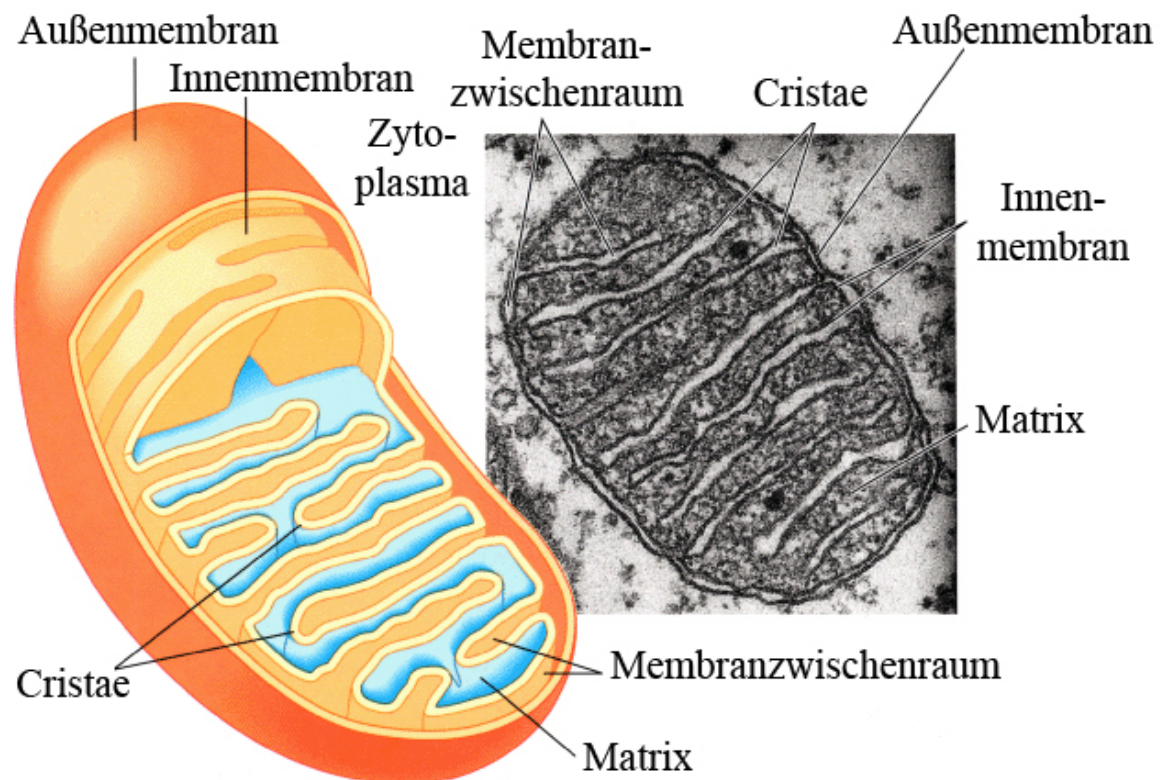


Abbildung 3: Schematische Darstellung und elektronenmikroskopisches Bild eines Mitochondriums (verändert nach Mathews und Van Holde 1996)

Anzahl und Form der Mitochondrien differieren mit dem Zelltyp. Sie treten bevorzugt in Zellen mit hohem Energiebedarf auf. Erythrozyten besitzen keine Mitochondrien, Lymphozyten lediglich 10 bis 20, Gehirnzellen oder Hepatozyten enthalten einige hundert Mitochondrien (Cossarizza und Moyle 2004). Mitochondrien können sich in der Zelle bewegen und ihre Form ändern.

Jedes Mitochondrium besitzt zwei Membranstrukturen, die sich deutlich voneinander abheben. Eine Außenmembran grenzt das Organell zum Zytoplasma hin ab und enthält Transportproteine, die Kanäle für den Stoffaustausch bilden. Ein schmaler Membranzwischenraum trennt die Außenmembran von der hochstrukturierten Innenmembran ab. Diese besitzt in die innere Matrix des Mitochondriums hinein zahlreiche, vielfältig gestaltete Einstülpungen, sog. Cristae, nach denen die Mitochondrien in verschiedene Typen klassifiziert werden können. Anzahl und Ausmaß dieser Einstülpungen zeigen eine Abhängigkeit von der Stoffwechselaktivität der entsprechenden Zelle. In der mitochondrialen Matrix befinden sich unter anderem die Enzyme der β -Oxidation der Fettsäuren und des Citratcyclus. Mitochondrien enthalten wie Prokaryonten ein eigenes, ringförmiges DNA-Molekül. Die bei Eukaryonten assoziierten Histonkomplexe fehlen. Sie verfügen auch über eigene Ribosomen, die Ähnlichkeit mit denen der Protozyten aufweisen (Löffler 1998b).

Jedes Mitochondrium enthält 2 bis 10 Kopien mitochondrialer DNA (mtDNA) sowie die notwendigen Proteine für die Nukleinsäuresynthese, Phosphorylierung, Transkription und Translation. Die ringförmige mitochondriale DNA des Menschen liegt als Doppelstrang vor und besteht aus 16569 Basenpaaren. Diese kodieren für die beiden rRNAs der mitochondrialen Ribosomen und für die 22 tRNAs, die für die Proteinbiosynthese benötigt werden. Die mtDNA enthält zusätzlich noch die Gene für 13 Proteine, die Bestandteile der Multienzymkomplexe I, III, IV und der mitochondrialen F_1/F_0 -ATPase (Komplex V) sind. Damit werden ca. 15 % der mitochondrialen Proteine kodiert, die übrigen Proteine sind jedoch kerncodiert (Brinkman et al. 1998; Löffler 1998b). Die mtDNA macht ungefähr 1 % der zellulären DNA aus und ist die einzige extranukleäre DNA. Sie weist eine um ca. das Zehnfache erhöhte Mutationsrate gegenüber der nukleären DNA (nDNA) auf, da sie einer höheren Konzentration von reaktiven sauerstoffhaltigen Nebenprodukten der oxidativen Phosphorylierung ausgesetzt ist. Die mtDNA wird nicht durch Histone geschützt und besitzt auch nicht alle Reparaturmechanismen des Zellkerns. Somit können durch nicht behobene Replikationsfehler oder durch exogene DNA-Schäden vermehrt Mutationen entstehen (Copeland et al. 2003).

Das mtDNA-Replisom, ein aus mehr als 20 Proteinen bestehender Komplex, der an der Mitochondrieninnenmembran lokalisiert ist, repliziert die mtDNA. Die Hauptkomponente des mtDNA-Replisoms ist die Polymerase γ . Dieses Enzym besteht aus einem α , β -Heterodimer und wird von der nDNA kodiert. Die katalytische α -Untereinheit ist 140 kD

groß und führt sowohl die Polymerase- als auch die in 3'-5'-Richtung korrekturlesende Exonukleaseaktivität aus (Naviaux et al. 1999).

4.2 Funktion und Bedeutung des Mitochondriums

Die hochorganisierte Innenmembran des Mitochondriums ist als Träger der Komponenten der Elektronentransportkette und der oxidativen Phosphorylierung für die Bereitstellung von Energie in Form von ATP und damit für den Stoffwechsel der Zelle von entscheidender Bedeutung. In der mitochondrialen Innenmembran gewinnen aerob lebende Zellen ihre Energie durch Kopplung der sauerstoffabhängigen Reoxidation wasserstoffübertragender Coenzyme mit der Bildung von ATP. Der Sauerstoff wird zu Wasser reduziert. Für die Reoxidation der Reduktionsäquivalente NADH/H^+ und FADH_2 sind die vier elektronentransportierenden Multienzymkomplexe I - IV der Atmungskette zuständig, wobei Ubichinon bzw. Cytochrom c die Verbindung zwischen den Komplexen herstellen (Abbildung 4).

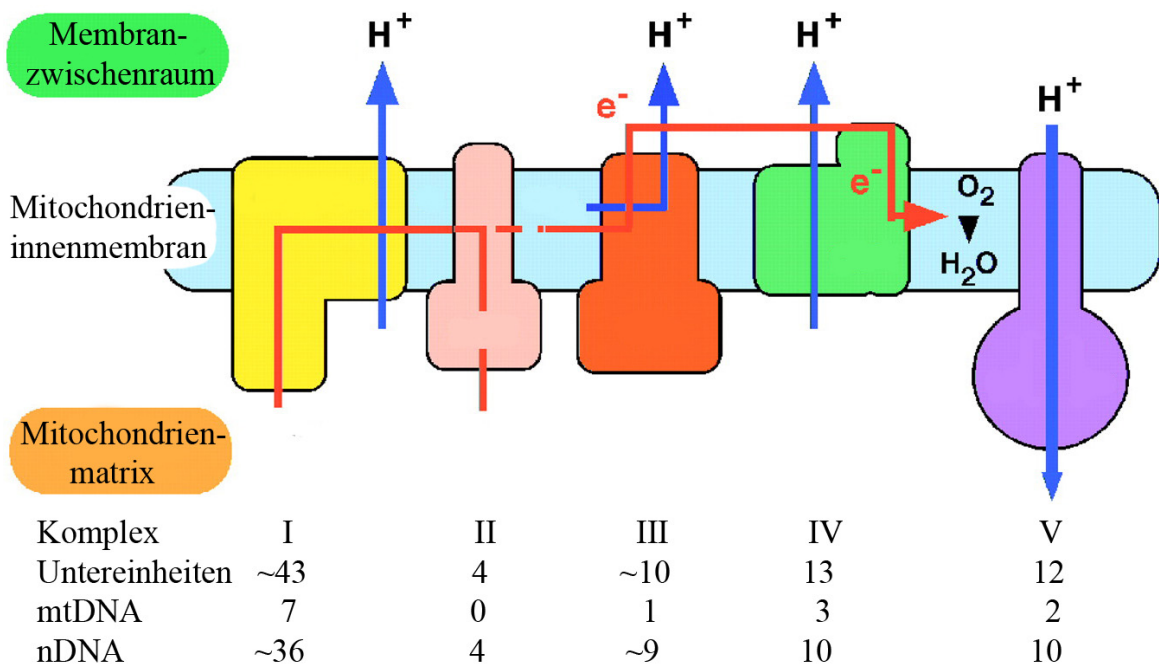


Abbildung 4: Die oxidative Phosphorylierung mit den vier Multienzymkomplexen (I - IV) und der F_1/F_0 -ATPase (V). Jeder Komplex besteht aus mehreren Untereinheiten, die von nukleärer oder mitochondrialer DNA kodiert werden (verändert nach Brinkman et al. 1998; Saraste 1999)

Durch den Transport von Protonen aus der Mitochondrienmatrix in den Membranzwischenraum wird ein elektrochemischer Gradient über der Mitochondrieninnenmembran aufgebaut. Dieser liefert die von der mitochondrialen F_1/F_0 -ATPase (Komplex V) für die ATP-Bildung benötigte Energie (Löffler 1998a).

Der elektrochemische Gradient setzt sich aus dem so genannten mitochondrialen Membranpotential (MMP) und den pH-Gradienten zusammen. Das MMP beinhaltet den Großteil der Energie dieses elektrochemischen Gradienten. Vereinfachend kann deshalb das MMP allein als Indikator für den Energiestatus des Mitochondriums betrachtet werden. Die Aufrechterhaltung des MMPs ist für die Funktion vor allem von Zellen mit hohem Energieverbrauch von großer Bedeutung (Mathur et al. 2000). Eine Abweichung vom normalen MMP ermöglicht Aussagen über den Einfluss von Erkrankungen, aber auch von therapeutischen Maßnahmen auf den Zustand dieser Zellen.

Das bei der oxidativen Phosphorylierung synthetisierte ATP wird für energieverbrauchende Reaktionen in der Mitochondrienmatrix benötigt oder mit Hilfe des Adenin-Nukleotid-Translokators im Austausch gegen zytosolisches ADP in das Zytosol geschleust (Brinkman et al. 1998).

Bei der oxidativen Phosphorylierung entstehen aus 2 - 4 % der Elektronen, die die Elektronentransportkette durchlaufen, reaktive sauerstoffhaltige Produkte (ROS, reactive oxygen species) wie $O_2^{\cdot-}$ (Wallace 1999). Diese $O_2^{\cdot-}$ -Radikale werden durch die mitochondriale Mangan-Superoxid-Dismutase (MnSOD) in Wasserstoffperoxid umgewandelt, das wiederum durch die Glutathionperoxidase zu Wasser entgiftet wird. Durch Defekte in der Elektronentransportkette akkumulieren die Elektronen und reagieren direkt mit molekularem Sauerstoff unter Bildung von H_2O_2 und den Radikalen $O_2^{\cdot-}$ und OH^{\cdot} . Die in der Atmungskette gebildeten reaktiven sauerstoffhaltigen Produkte verändern oxidativ Biomoleküle. Das Ungleichgewicht zwischen Produktion und zellulärer Entgiftung der ROS wird oxidativer Stress genannt.

Geschädigte Mitochondrien können die Apoptose einer Zelle einleiten. Verschiedene Faktoren wie der Einstrom von Calcium-Ionen, der Anstieg der ROS oder ein mitochondrialer Energieabfall können die Öffnung eines unspezifischen Kanals in der inneren Mitochondrienmembran, die mitochondrial permeability transition pore (mtPTP), induzieren. Die mtPTP wird von einem Komplex aus dem voltage dependent anion channel, dem Adenin-Nukleotid-Translokator, Bax und Cyclophilin D gebildet (Wallace 1999).

Die Öffnung der mtPTP verursacht die Freisetzung der die Apoptose einleitenden Faktoren wie Cytochrom c, den apoptosis-inducing factor und die Kaspasen. Von Bedeutung ist der damit verbundene Abfall des mitochondrialen Membranpotentials (MMP).

5. Mitochondriale Schädigungen durch die HIV-Infektion

Die HIV-Infektion kann eine direkte Schädigung der Mitochondrien hervorrufen (Lewis et al. 2003). Bestimmte HIV-Genprodukte, vor allem Tat und Vpr, bewirken *in vitro* eine Dysfunktion der Mitochondrien. In Mäusen, bei denen Tat transkribiert wurde, traten eine Veränderung des zellulären Glutathiongehalts sowie eine Suppression der mitochondrialen Mangan-Superoxid-Dismutase-Aktivität auf und führten zu oxidativem Stress (Lewis et al. 2003). Vpr leitet vermutlich durch seine Wirkung auf die mtPTP die Apoptose unabhängig von Kaspasen ein. Die HIV-Protease könnte über die Aktivierung von Prokaspasen und durch die Spaltung antiapoptotischer Proteine die Apoptose auslösen (Arnoult et al. 2003). Die HIV-Infektion verursacht einen Anstieg von Zytokinen wie den Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) oder das Interferon- α (IFN- α), die die oxidative Phosphorylierung hemmen und zur Apoptose führen (Cossarizza und Moyle 2004).

Die Überproduktion von Stickstoffmonoxid (NO), die bei HIV-infizierten Patienten beobachtet wird, könnte ebenfalls eine Rolle spielen. NO inhibiert die Replikation des HI-Virus. Darüber hinaus hat es auch zytotoxische Effekte und verursacht durch Hemmung der oxidativen Phosphorylierung oxidativen Stress (Torre und Pugliese 2005).

Das HI-Virus kann den mtDNA-Gehalt in Mitochondrien verringern und die Atmungskette schädigen (Miro et al. 2005). In Muskel- und Nervenzellen von nicht therapierten HIV-infizierten Patienten mit Myopathie oder peripherer Neuropathie wurden eine mtDNA-Depletion sowie strukturelle und funktionelle Veränderungen in Mitochondrien nachgewiesen (Moyle 2005).

6. Mitochondriale Schädigungen bei der Therapie mit Nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren

Eine HIV-Infektion erhöht die Anfälligkeit für die mitochondrialen Nebenwirkungen einer antiretroviralen Therapie (Miro et al. 2004). Zu den Langzeitnebenwirkungen einer antiretroviralen Therapie gehören unter anderem periphere Polyneuropathie, Lipodystrophie, Laktatazidose, Myopathie und Veränderungen des Knochenstoffwechsels

und des Blutbildes. Diese Stoffwechsel- und Organveränderungen sind vermutlich auch auf den schädigenden Einfluss einer Therapie mit NRTIs auf die Mitochondrien zurückzuführen. Die Nebenwirkungen zeigen Ähnlichkeit mit dem Krankheitsbild, das auch bei genetisch bedingten Defekten in Mitochondrien beobachtet werden kann. Viele Untersuchungen befassen sich mit dem Einfluss einer antiretroviralen Therapie mit NRTIs auf die Funktion von Mitochondrien und belegen diesen mit dem Schlagwort „mitochondriale Toxizität“ (Brinkman et al. 1999).

NRTIs hemmen nicht nur die Reverse Transkriptase des HI-Virus sondern auch die zellulären DNA-Polymerasen. Besonders die DNA-Polymerase β und die DNA-Polymerase γ sind gegenüber NRTIs empfindlich (Brinkman et al. 1998). Nach Kakuda nimmt der hemmende Einfluss von NRTIs auf Polymerasen in folgender Reihe ab: HIV-RT \gg DNA-Polymerase γ $>$ DNA-Polymerase β $>$ DNA-Polymerase α = DNA-Polymerase ϵ (Kakuda 2000).

In den Mitochondrien ist lediglich die DNA-Polymerase γ vorhanden. Untersuchungen über die Hemmung der Polymerase γ durch NRTIs in vitro ergaben folgende Hierarchie: Zalcitabin = Didanosin = Stavudin \gg Lamivudin $>$ Tenofovir $>$ Zidovudin $>$ Abacavir (Kakuda 2000; Johnson et al. 2001). Da die DNA-Polymerase γ für die Replikation und die Reparatur der mtDNA zuständig ist, ist anzunehmen, dass eine Inhibition dieses Enzyms die Funktion der Mitochondrien beeinflussen kann. Die Hemmung der Polymerase γ durch NRTIs führt zu einer quantitativen Verminderung (Depletion) der in jedem Mitochondrium in mehrfacher Kopie vorliegenden mtDNA. Die mtDNA kodiert 13 Proteine der Atmungskette. Ein verminderter mtDNA-Gehalt führt deshalb aufgrund einer reduzierten Zahl an Proteinen der oxidativen Phosphorylierung zu einer Funktionsstörung in der Atmungskette.

Dadurch entstehen vermehrt reaktive sauerstoffhaltige Produkte (ROS), die durch Oxidation Biomoleküle wie Proteine, Lipide und auch die mtDNA verändern. Die Polymerase γ ist gegenüber diesen Noxen besonders anfällig (Graziewicz et al. 2002). Durch das Ungleichgewicht zwischen Produktion und zellulärer Beseitigung der ROS kommt es zum bereits erwähnten oxidativen Stress. Es liegt ein so genannter Teufelskreis vor: Die NRTIs hemmen die Polymerase γ und damit die Replikation der mtDNA. Dadurch kommt es zu einer Verminderung der Enzyme der oxidativen Phosphorylierung. Durch diesen Defekt in der Atmungskette werden vermehrt ROS gebildet und führen zu

oxidativem Stress, der wiederum eine Schädigung der mtDNA und der Polymerase γ bewirkt.

Höher dosierte Gaben an NRTIs rufen eine stärkere mtDNA-Depletion hervor. Zwei oder mehrere NRTIs können sich in ihrer Wirkung auf die Mitochondrien gegenseitig verstärken.

Die Depletion der mtDNA ist auch von der Dauer der Therapie abhängig. Nebenwirkungen wie z.B. eine periphere Polyneuropathie, eine Lipodystrophie oder eine Myopathie, die mit einer mitochondrialen Funktionsstörung assoziiert sind, treten in höherem Maße erst nach prolongierter NRTI-Exposition auf. Die Einnahme über einen längeren Zeitraum hinweg führt auch in geringerer Dosierung zu Nebenwirkungen. Es kommt jedoch erst dann zu Stoffwechseleränderungen, wenn ein bestimmter Schwellenwert an mtDNA unterschritten wird. Diesen Schwelleneffekt beobachtet man auch bei Erbkrankheiten, bei denen eine mitochondriale Schädigung vorliegt (Wallace 1999; Walker 2006).

Die mitochondrialen Schädigungen durch eine Therapie mit NRTIs sind von der Konzentration ihrer Triphosphatderivate im Mitochondrium abhängig. NRTIs müssen in Triphosphate umgewandelt werden, bevor sie in die DNA eingebaut werden können. Die Phosphorylierung findet entweder im Mitochondrium oder im Zytosol statt, von dem die Triphosphate dann in das Mitochondrium transportiert werden. Die intramitochondriale Aufnahme sowie die Aktivierung der NRTIs durch Phosphorylierung ist vom Gewebe abhängig (Walker 2006).

Neben der direkten Hemmung der Polymerase γ beruht die mitochondriale Schädigung durch NRTIs wahrscheinlich noch auf weiteren Mechanismen wie dem Kettenabbruch nach Einbau des NRTIs in die mtDNA oder der Persistenz eingebauter NRTIs durch eine unzureichende Excisionsreparatur (Lewis et al. 2003).

NRTIs wirken direkt mutagen Wirkung auf die mtDNA. So traten bei Patienten, die mit Zidovudin therapiert wurden, Mutationen in der mtDNA auf (Martin et al. 2003).

Da nur 15 – 20 % aller Patienten, die einer NRTI-Therapie unterzogen wurden, mitochondriale Schädigungen aufwiesen, scheint auch eine genetische Prädisposition vorzuliegen. Auch gesunde Menschen können neben intakter auch mutierte mtDNA in ihren Zellen besitzen. Bei Personen mit zum Teil fehlerhafter mtDNA kann dieser genetische Defekt erst durch eine NRTI-Therapie evident werden. Eine Prädisposition für die NRTI-Sensitivität könnte auch in Form des single nucleotide polymorphism in Genen

des Nukleus auftreten, die für die mtDNA und die Atmungskette zuständig sind (Lewis et al. 2003).

7. Klinisches Spektrum der mitochondrialen Funktionsstörung

Antiretroviral wirkende Medikamente, besonders jedoch Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI), haben aufgrund ihrer schädigenden Wirkung auf die Mitochondrien einen großen Einfluss auf das klinische Bild therapierter HIV-infizierter Patienten.

7.1 Periphere Polyneuropathie

Bei HIV-infizierten Patienten, die versuchsweise mit Zalcitabin, Didanosin oder Stavudin therapiert wurden, trat unerwartet eine von der Dosis abhängige symmetrische periphere Polyneuropathie auf. Die periphere Polyneuropathie wurde damit zu einem die antiretrovirale Therapie limitierenden Faktor (Cossarizza und Moyle 2004). Die NRTI-assoziierte periphere Polyneuropathie unterscheidet sich klinisch nur geringfügig von der HIV-assoziierten distalen symmetrischen Neuropathie. Sie tritt jedoch spontan auf, verläuft schmerzhafter und rapid progressiv. Klinisch treten distaler Gefühlsverlust, Dysästhesien, Areflexie und Muskelschwäche auf. Untersuchungen in vitro zeigten, dass Zalcitabin und Didanosin den mtDNA-Gehalt von Nervenzellen reduzieren und eine Depletion von Mitochondrien hervorrufen können. Andere Studien ergaben jedoch, dass pharmakologisch relevante Konzentrationen von Stavudin, Zidovudin und Lamivudin keine Auswirkung auf die Regeneration von Neuriten haben. Untersuchungen an Nervenzellen bei Patienten mit NRTI-assoziiierter peripherer Polyneuropathie zeigten abnorm vergrößerte Mitochondrien mit stark erhöhter Vakuolisierung, elektronendichten konzentrischen Einschlüssen und degenerativen Myelinstrukturen. Ein durch die Therapie mit NRTIs hervorgerufener niedriger Acetyl-L-Carnitin-Gehalt könnte zu einem verminderten mitochondrialen Metabolismus sowie einem Anstieg von toxischen Fettsäuren und dadurch zu einer peripheren Polyneuropathie beitragen. Das Auftreten einer peripheren Polyneuropathie ist bei den meisten Patienten sicherlich multifaktoriell bedingt. Eine antiretrovirale Therapie mit NRTIs kann möglicherweise auch eine vorbestehende subklinische Störung evident werden lassen (Cossarizza und Moyle 2004).

7.2 Lipodystrophie

Eine Langzeit-HAART kann eine Lipodystrophie verursachen. Diese Lipodystrophie ist gekennzeichnet durch eine Fettverteilungsstörung. Es kommt zu einem völligen Verlust subkutanen Fetts an Extremitäten und Gesicht (Lipoatrophie) und einer Fettansammlung intraabdominell und im Nacken (Lipohypertrophie). Die Lipoatrophie und die Lipohypertrophie können auch einzeln auftreten (Casula et al. 2007). Kohortenstudien weisen darauf hin, dass HIV-infizierte, antiretroviral therapierte Patienten eher eine Lipoatrophie als eine Lipohypertrophie zeigen (Palella et al. 2004; Bacchetti et al. 2005). Die Pathogenese der Lipodystrophie ist komplex. Als Ursachen werden unter anderem Störungen der Adipozytendifferenzierung, die vermehrte Bildung proinflammatorischer Zytokine (TNF- α) sowie eine mitochondriale Funktionsstörung im Rahmen einer Therapie mit NRTIs diskutiert (Hartmann 2006). Besonders Stavudin scheint vor allem bei einer Langzeittherapie für die Entstehung einer Lipodystrophie verantwortlich zu sein. In subkutanen Fettzellen treten Mitochondrien mit strukturellen Anomalien auf. Eine prolongierte Therapie mit NRTIs führt in Adipozyten zu einer vermehrten Expression adipogener Transkriptionsfaktoren, einem verminderten Fettgehalt und einer erhöhten Apoptoserate (Walker 2006). Ein Therapiewechsel von Stavudin zu Zidovudin oder zu Abacavir reduziert die Apoptoserate von Adipozyten (McComsey und Lonergan 2004).

7.3 Hepatotoxizität

Alle zur Therapie der HIV-Infektion eingesetzten NRTIs sind potentiell hepatotoxisch. Besonders starke Inhibitoren der Polymerase γ , die so genannten D-Drugs Didanosin, Stavudin und Zalcitabin, verursachen in Abhängigkeit von der Dauer der Therapie eine mtDNA-Depletion im Lebergewebe. Durch Hemmung der Fettsäureoxidation kommt es zur Akkumulation von Fetttröpfchen in den Zellen. Leberbiopsien zeigen histologisch eine makro- und mikrovesikuläre Steatose mit veränderten Mitochondrien (McKenzie et al. 1995). Eine mitochondriale Funktionsstörung könnte auch eine von mehreren möglichen Ursachen in der Pathogenese einer Steatohepatitis mit erhöhten Serumtransaminase-Werten sein. Diese wurde bei einer Didanosin-Monotherapie beschrieben und kann, begleitet von einer Laktatazidose, zum Leberversagen führen (Walker 2006).

7.4 Myopathie

Die erste Nebenwirkung, bei der als Ursache eine Funktionsstörung der Mitochondrien aufgrund einer Therapie von HIV-infizierten Patienten mit NRTIs vermutet wurde, war eine Myopathie (Cossarizza und Moyle 2004). Dieser Zusammenhang wurde erstmals bei einer Therapie mit Zidovudin beschrieben (Arnaudo et al. 1991; White 2001). Meist kommt es erst nach mehrmonatiger Therapie zu einer belastungsabhängigen Skelettmuskelschwäche, zu Muskelschmerzen und zum Abbau von Muskelmasse, häufig verbunden mit einer Erhöhung der Kreatinkinase. Seltener treten ernsthafte Erkrankungen wie eine Rhabdomyolyse und eine hypertrophische Kardiomyopathie auf (Cossarizza und Moyle 2004). Durch Muskelbiopsie kann eine therapieinduzierte Myopathie histologisch von der durch eine HIV-Infektion hervorgerufene Myopathie unterschieden werden (Brinkman et al. 1998). Die Pathogenese dieser Myopathie ist weitgehend unklar. Die toxische Wirkung von Zidovudin kommt vermutlich eher durch die Hemmung des Adenin-Nukleotid-Translokators und der Adenylatkinase zustande als durch die Hemmung der Polymerase γ (Cossarizza und Moyle 2004). Der mtDNA-Gehalt in Skelettmuskelzellen therapie-naiver HIV-infizierter Patienten ist im Vergleich zu dem mtDNA-Gehalt gesunder Probanden bzw. dem mit NRTIs therapierter Patienten verringert (Haugaard et al. 2005).

7.5 Hyperlaktatämie und Laktatazidose

NRTIs beeinträchtigen den aeroben Stoffwechsel in den Mitochondrien von Hepatozyten. Ein damit verbundenes Defizit an ATP wird durch eine vermehrte Glykolyse ausgeglichen. Kann das dabei entstehende Pyruvat in der oxidativen Decarboxylierung nicht ausreichend abgebaut werden, entsteht vermehrt Laktat. Neben einer Erhöhung des Serumlaktat-Wertes im Blut führt die Schädigung der Mitochondrien auch zu einer verminderten Laktatutilisation in Herz, Leber und Skelettmuskel (Walker 2004). Der anaerobe Metabolismus kann zu einer Erhöhung der H^+ -Ionen-Konzentration und damit zu einer Azidose führen (White 2001). Die Laktatazidose ist durch eine metabolische Azidose mit einem pH-Wert im Serum unter 7,36 und einem Serumlaktatspiegel von über 5 mmol/l charakterisiert. Die Laktathomöostase ist dekompenziert (John und Mallal 2002). Bei 14 % der Patienten mit NRTI-Therapie trat pro Behandlungsjahr eine asymptotische Hyperlaktatämie mit einer Laktatkonzentration von 2 - 5 mmol/l auf (Schiller 2004). John und Mallal vermuten, dass die vermehrte Bildung von Laktat durch laktatsenkende Mechanismen eines homöostatischen Systems ausgeglichen wird (John und Mallal 2002).

Im Gegensatz zur Hyperlaktatämie ist das Auftreten einer Laktatazidose bei 0,7 % der therapierten Patienten pro Behandlungsjahr relativ gering. Es wird jedoch von lebensbedrohenden Organschädigungen berichtet. Zunächst sind die Symptome einer Hyperlaktatämie und Laktatazidose sehr unspezifisch. Es kann zu Übelkeit, Erbrechen, rechtsseitigen Oberbauchschmerzen, Dyspnoe, Müdigkeit, Krämpfen und Myalgien kommen (Schiller 2004). Als besonders schädigend hat sich der therapeutische Einsatz von Stavudin und/oder Didanosin erwiesen (Schiller 2004).

7.6 Weitere klinische Manifestationen mitochondrialer Funktionsstörungen

HIV-infizierte Patienten haben aufgrund ihres Immundefektes und als Nebenwirkung einer antiretroviralen Therapie ein erhöhtes Risiko, an einer Pankreatitis zu erkranken (White 2001). Eine manifeste Pankreatitis tritt bei einer NRTI-Therapie, insbesondere mit Didanosin, mit einer Häufigkeit von 0,8 pro 100 Behandlungsjahren auf. Ein Zusammenhang zwischen einer Pankreatitis und einer mitochondrialen Funktionsstörung durch NRTIs wird vermutet, kann aber nicht sicher belegt werden. Das trifft auch für eine mitochondriale Schädigung von Nephronen zu. Tenofovir schädigt vermutlich die Mitochondrien von Nierenzellen (Walker 2006).

Auch die Auswirkung einer Therapie mit NRTIs auf die Hämatopoese ist noch weitgehend ungeklärt.

Ein Zusammenhang mit einer mitochondrialen Funktionsstörung bei weiteren Nebenwirkungen einer antiretroviralen Therapie wie Allergien, Osteopenie, avaskuläre Knochennekrosen, gastrointestinale Beschwerden und Diabetes mellitus ist bisher nicht nachgewiesen.

8. Auswirkungen einer HIV-Infektion und einer antiretroviralen Therapie auf die Mitochondrien von peripheren mononukleären Blutzellen

8.1 Periphere mononukleäre Blutzellen als Untersuchungsobjekt

Von besonderem Interesse und Inhalt dieser Arbeit sind die Auswirkungen einer HIV-Infektion selbst und einer antiretroviralen Therapie auf die peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC, peripheral blood mononuclear cell). PBMCs eignen sich besonders gut als Untersuchungsobjekt, da sie einen wichtigen Angriffspunkt für das HI-Virus und damit auch für eine antiretrovirale Therapie darstellen. PBMCs sind mononukleäre Zellen wie

Lymphozyten und Monozyten und besitzen Mitochondrien. Deshalb ermöglicht die Untersuchung der mitochondrialen Funktion von PBMCs Aussagen über den Einfluss der HIV-Infektion und einer antiretroviralen Therapie auf diese Zellen. Der mitochondriale Zustand von PBMCs kann z.B. durch die Bestimmung des mtDNA-Gehalts oder durch die Messung des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) untersucht werden.

8.2 Auswirkung einer HIV-Infektion auf die Mitochondrien von peripheren mononukleären Blutzellen

Eine HIV-Infektion kann hämatologische Veränderungen wie Anämie, Neutropenie und Thrombozytopenie hervorrufen. Bei HIV-infizierten Patienten wird die CD4-Zellzahl entweder direkt durch die Expression von HIV-Genen in infizierten Zellen oder indirekt durch die Einleitung der Apoptose von nicht infizierten Zellen verringert. Infizierte Zellen werden durch zytotoxische T-Zellen sowie durch eine durch Antikörper verursachte zelluläre Toxizität zerstört (Gougeon und Montagnier 1999).

Durch eine HIV-Infektion kommt es auch zu einer verminderten Aktivität der Komplexe der Atmungskette und der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase und dadurch zu einer eingeschränkten Mitochondrienfunktion (Miro et al. 2004).

Mehrere Untersuchungen ergaben, dass bei HIV-infizierten, therapienaiven Patienten der Gehalt an mtDNA im Vergleich zu dem gesunder Probanden erniedrigt war (Miura et al. 2003; de Mendoza et al. 2004; Maagaard et al. 2006).

Macho et al. stellten bei HIV-infizierten, therapienaiven Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden eine Verminderung des MMPs in PBMCs fest (Macho et al. 1995). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Polo et al. bei der Messung des MMPs von PBMCs mit dem JC-1-Assay. Der Anteil an Mitochondrien mit Dysfunktion war bei HIV-infizierten, therapienaiven Patienten im Vergleich zu dem bei gesunden Probanden erhöht (Polo et al. 2003). Bei Patienten mit akutem HIV-Syndrom zeigten die PBMCs sowohl eine Verminderung des MMPs als auch eine erhöhte Apoptoserate (Cossarizza et al. 1997). Long-term-non-progressors (LTNP) wiesen im Vergleich zu Patienten mit AIDS eine erniedrigte Apoptoserate und eine höheres MMP auf (Moretti et al. 2000).

8.3 Auswirkungen einer antiretroviralen Therapie auf die Mitochondrien von peripheren mononukleären Blutzellen

Eine antiretrovirale Therapie führt zu einem Anstieg der CD4-Zellzahl und vermindert die Viruslast (Arnoult et al. 2003). Eine geringere Viruslast hat eine reduzierte Produktion von HIV-Proteinen mit proapoptotischer Wirkung zur Folge (Jimenez et al. 2002). Sowohl die Aktivierung des Immunsystems als auch die Apoptoserate der CD4-Zellen nehmen ab und die Überlebenszeit der CD4-Zellen wird verlängert (Böhler et al. 1999).

Die meisten Studien befassen sich mit den Auswirkungen einer antiretroviralen Therapie auf die Mitochondrien von PBMCs durch Bestimmung des mtDNA-Gehalts. Die Ergebnisse sind zum Teil widersprüchlich.

Bei HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten konnte im Vergleich zu HIV-infizierten, therapienaiven Patienten unabhängig vom Therapieregime keine Veränderung des mtDNA-Gehalts in PBMCs festgestellt werden (Chiappini et al. 2004; Maagaard et al. 2006).

Andere Studien lassen auf eine Depletion der mtDNA in PBMCs bei der Therapie mit NRTIs schließen. HIV-infizierte, antiretroviral therapierte Patienten mit einer symptomatischen Hyperlaktämie wiesen einen verminderten mtDNA-Gehalt im Vergleich zu therapienaiven Patienten und gesunden Probanden auf. Bei Abbruch der Therapie normalisierte sich der Gehalt an mtDNA in den PBMCs wieder (Montaner et al. 2003). Eine Depletion der mtDNA erscheint bei der Therapie von Didanosin und/oder Stavudin noch am wahrscheinlichsten (Montaner et al. 2003; Lopez et al. 2004). Patienten, die mit Stavudin therapiert wurden, wiesen gegenüber HIV-infizierten, antiretroviral therapienaiven Patienten, deren mtDNA-Gehalt im Vergleich zu dem gesunder Probanden bereits erniedrigt war, einen noch geringeren Gehalt an mtDNA auf. Der mtDNA-Gehalt von HIV-infizierten Patienten mit einer antiretroviralen Therapie ohne Stavudin war jedoch im Vergleich zu dem von therapienaiven Patienten erhöht (de Mendoza et al. 2004). Untersuchungen von Casula et al. ergaben, dass bei HIV-infizierten Patienten 48 Wochen nach Beginn einer antiretroviralen Therapie der mtDNA-Gehalt in den PBMCs angestiegen war (Casula et al. 2005). Bei Cote findet sich eine tabellarische Übersicht von Studien über den Einfluss von NRTIs auf die mtDNA verschiedener Zelltypen (Cote 2005).

Der Einfluss einer antiretroviralen Therapie auf das MMP von PBMCs wurde bisher kaum untersucht. Polo et al. konnten bei HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten im

Vergleich zu HIV-infizierten, antiretroviral therapienaiven Patienten signifikant mehr Mitochondrien in PBMCs mit einem erniedrigten MMP nachweisen (Polo et al. 2003).

Proteaseinhibitoren greifen nicht nur direkt in die Replikation des HI-Virus ein, sondern beeinflussen auch durch ihre antiapoptotische Wirkung die HIV-Infektion. Sie verringern die Expression von Regulatormolekülen der Apoptose, hemmen die Kaspasen und verhindern die Abnahme des MMPs (Miro et al. 2005). Nelfinavir wirkt durch die Aufrechterhaltung des MMPs antiapoptotisch (Phenix et al. 2002). Die Folge ist bei Lymphozyten eine verbesserte Funktion und eine verlängerte Lebensdauer.

9. Therapieansätze zur Verminderung mitochondrialer Schädigungen

Eine antiretrovirale Therapie mit NRTIs verursacht bei HIV-infizierten Patienten mit zunehmender Dauer Nebenwirkungen, die zum Teil auch auf einer Störung der Mitochondrienfunktion beruhen. Diese Nebenwirkungen sind nach Absetzen der entsprechenden Medikamente zumindest teilweise reversibel. Ein Therapiewechsel von Didanosin, Stavudin und Zalcitabin zu Inhibitoren geringerer Toxizität wie Tenofovir, Lamivudin, Emtricitabin oder Abacavir vermindert die Schädigung der Mitochondrien (Cossarizza und Moyle 2004). Deshalb sollte als Ersttherapie möglichst eine Kombination aus weniger toxischen Stoffen gewählt werden. Bei leichten Nebenwirkungen kann auch eine Reduktion der Dosis oder eine kurze Therapiepause erwogen werden. Starke Nebenwirkungen wie z.B. eine Laktatazidose erfordern ein sofortiges Absetzen der antiretroviralen Medikamente.

Zur Prävention und Therapie von mitochondrialen Schädigungen durch NRTIs können eventuell bestimmte Zusatzstoffe eingesetzt werden. Dabei handelt es sich meist um Nahrungsergänzungsmittel und Vitamine. Der therapeutische Nutzen dieser Stoffe bei mitochondrialen Schädigungen ist wissenschaftlich kaum erforscht. Auch sind die Ergebnisse der Studien oft widersprüchlich (Brinkman und Kakuda 2000).

Ein neuartiger therapeutischer Ansatzpunkt ist der Einsatz von Uridin. Die Hemmung der Atmungskette durch NRTIs bewirkt unter anderem eine Hemmung der Dihydroorotatdehydrogenase (DHODH), die für die Synthese von Uridin in der Zelle essentiell ist (Walker 2005) (Abbildung 5). Dadurch sinkt in den Mitochondrien der Gehalt an Pyrimidinen, die aus Uridin synthetisiert werden. Dieser Mangel an mitochondrialen Pyrimidinen wird durch die Zufuhr von Pyrimidinen aus dem Zytosol ausgeglichen. Dabei

werden auch NRTIs mit Pyrimidinstruktur in das Mitochondrium transportiert und damit die Konzentration der Pyrimidinanaloga erhöht. Diese hemmen wiederum die Polymerase γ , wodurch letztlich die mtDNA-Depletion verstärkt wird. Durch die prophylaktische oder therapeutische Gabe von Uridin kann dieser Teufelskreis unterbrochen und die Konzentration der mitochondrialen DNA in den Zellen erhöht werden (Walker 2006). Die Uridinsubstitution wird vom Menschen auch in sehr hoher oraler oder intravenöser Dosierung gut vertragen. Eine Interaktion mit antiretroviralen Medikamenten ist nicht gegeben (Koch et al. 2003).

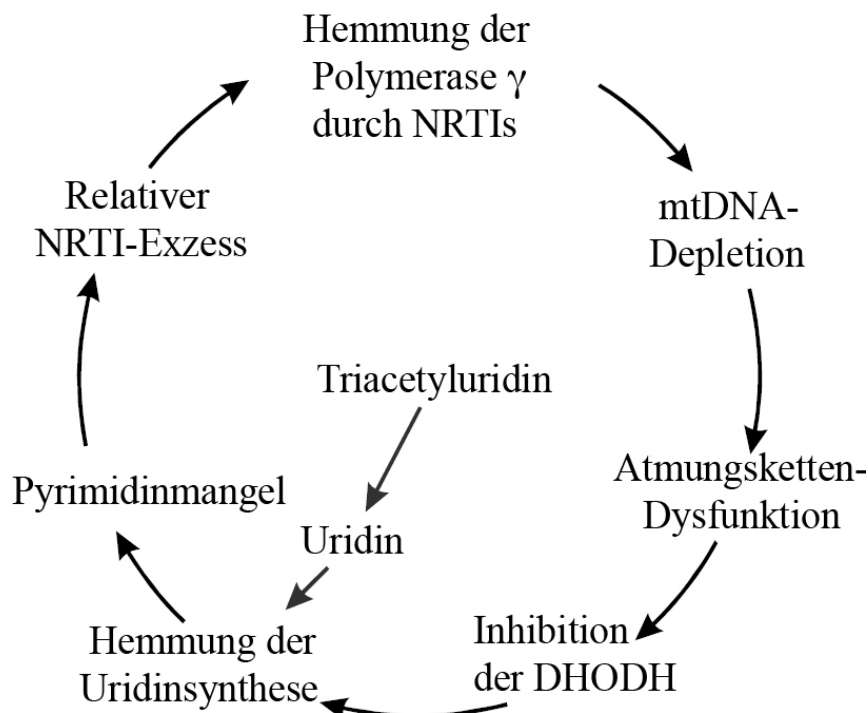


Abbildung 5: Vermuteter Mechanismus der Wirkung von Triacetyluridin bei der Therapie mitochondrialer Schädigungen durch NRTIs (verändert nach Walker 2005)

Die Substitution von Uridin reduzierte *in vitro* bei Hepatozyten Atmungskettendefekte, erhöhte den mtDNA-Gehalt und verhinderte auch den Zelltod. Die toxischen Auswirkungen von Zidovudin auf die hämatopoetischen Zellen im Knochenmark konnten ebenfalls verringert werden (Sommadossi et al. 1988). Walker und Venhoff berichten, dass der Einsatz von Uridin *in vitro* die negativen Auswirkungen einer Langzeittherapie mit Stavudin, Zalcitabin oder Zidovudin auf Adipozyten vermindert. Das betrifft die

Apoptoserate, die mtDNA-Depletion, Atmungskettendefekte und die Abnahme des MMPs (Walker und Venhoff 2005).

Zurzeit wird die therapeutische Wirksamkeit von Uridin bei den verschiedensten Erkrankungen untersucht. Dazu gehören Zystische Fibrose, Leberschäden, Karzinome, diabetische Neuropathie, Störungen des Zucker- und Fettstoffwechsels und einige Erkrankungen des Zentralnervensystems wie Schizophrenie und Parkinson (Connolly und Duley 1999).

Die Bioverfügbarkeit von Uridin ist relativ gering. Deshalb ist der Einsatz der Prodrug Triacetyluridin (2',3',5'-Tri-O-acetyluridin) günstig, da es kein Substrat der Uridinphosphorylase darstellt und auch keinen Pyrimidintransporter für die Resorption benötigt. Triacetyluridin wird oral verabreicht, im Gastrointestinaltrakt gut resorbiert und von unspezifischen Esterasen deacetyliert. Durch die Gabe von Triacetyluridin wird die Konzentration von Uridin im Plasma signifikant erhöht. Es werden sogar kurzfristig Konzentrationen von mehr als 100 μM im Plasma erreicht (Hidalgo et al. 2000).

10. Fragestellung und Zielsetzung

Der Einsatz hochwirksamer antiretroviraler Kombinationstherapien hat die Lebensqualität HIV-infizierter Patienten wesentlich verbessert und ihre Lebenserwartung erhöht. Besonders bei einer Langzeittherapie mit antiretroviral wirkenden Medikamenten treten jedoch unerwünschte Nebenwirkungen auf. Diese beruhen vermutlich zum Teil auf der Störung der Mitochondrienfunktion durch das HI-Virus selbst bzw. durch eine antiretrovirale Therapie mit z.B. Nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI). Derzeit sind aufgrund fehlender exakter Untersuchungsmethoden eindeutige Aussagen über mitochondriale Schädigungen durch die Virusinfektion selbst oder durch eine antiretrovirale Therapie noch nicht möglich.

Das Ziel von Forschungsarbeiten ist deshalb die Entwicklung einer einfach durchzuführenden und gering invasiven Möglichkeit zur Bestimmung einer mitochondrialen Funktionsstörung.

Eine frühzeitige Erkennung mitochondrialer Schädigungen könnte die Messung des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) in peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) mit dem JC-1-Assay ermöglichen. Mit dieser Untersuchungsmethode wäre dann

ein routinemäßiger Teil im Screening von HIV-infizierten Patienten vor und während einer antiretroviralen Therapie vor allem mit NRTIs gegeben (Moyle 2000).

Eine grundlegende Aufgabe dieser Arbeit war der Nachweis der Reproduzierbarkeit der Bestimmung des MMPs in PBMCs mit dem JC-1-Assay.

Ein Vergleich der Ergebnisse der Messung des MMPs bei gesunden Probanden und bei HIV-infizierten, therapie-naiven und antiretroviral therapierten Patienten sollte Aussagen über die Schädigung der Mitochondrien von PBMCs durch eine HIV-Infektion sowie durch eine antiretrovirale Therapie ermöglichen.

Um weitere Erkenntnisse über den schädigenden Einfluss einer HIV-Infektion bzw. einer antiretroviralen Therapie auf die Mitochondrien und die damit verbundenen Nebenwirkungen zu gewinnen, müssen die Messdaten im Zusammenhang mit den Ergebnissen klinischer, vor allem immunologischer Untersuchungen bei den betroffenen Patienten betrachtet werden.

Zwei Nebenwirkungen, für deren Entstehen eine mitochondriale Schädigung durch eine HIV-Infektion bzw. durch eine antiretrovirale Therapie angenommen werden kann, sind die Lipodystrophie und die periphere Polyneuropathie. Sollten sich bei diesen Erkrankungen auch Veränderungen des MMPs von PBMCs zeigen, so könnte dies die Hypothese erhärten.

Die Messung des MMPs von HIV-infizierten, bereits seit längerer Zeit antiretroviral therapierten Patienten ermöglicht nur Aussagen über die Auswirkungen einer Langzeittherapie auf den Funktionszustand der Mitochondrien. Deshalb sollte auch der Einfluss antiretroviral wirkender Medikamente auf das MMP bei HIV-infizierten, antiretroviral therapie-naiven vor und nach dreimonatiger antiretroviraler Therapie, also bei einer Kurzzeittherapie, untersucht werden.

Um die Schädigung der Mitochondrien und die damit verbundenen Nebenwirkungen einer antiretroviralen Therapie zu mindern, kann versuchsweise Triacetyluridin eingesetzt werden. Eine weitere Aufgabe dieser Arbeit war deshalb im Rahmen einer Studie die Messung des MMPs von PBMCs bei HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten vor und nach einer sechsmonatigen Behandlung mit Triacetyluridin, bei denen vom untersuchenden Arzt als Nebenwirkungen einer antiretroviralen Therapie eine periphere Polyneuropathie und/oder eine Lipodystrophie diagnostiziert wurden.

II. Material und Methoden

1. Material

1.1 Geräte

Absaug-System	VacuSafe & VACUBOY	Integra Biosciences, Fernwald
Brutschrank	HERAcell [®]	Heraeus, Hanau
CO ₂ -Gasflaschenmonitor	GM 2	
FACS-Gerät	FACScan	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Mikroskop	Leica DM IL	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Mischgerät	Reax 2	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Pipetten	Research [®] (fix)	Eppendorf AG, Hamburg
	Reference [®] (fix)	
	Multipette [®] plus	
	PIPETBOY acu	Integra Biosciences, Fernwald
Schüttelgerät	Vortex-Genie [®] 2	IKA [®] Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Sicherheitswerkbank	Safe 2010 Model 1.2	Heto-Holten, Allerød, Dänemark
Zentrifugen	Centrifuge 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg
	Rotanta/RPC	Hettich AG, Bäch, Schweiz

1.2 Verbrauchsmaterial

Aspirationspipetten	2,5 ml	Peske, Aindlingen-Arnhofen
Combitips [®] plus	5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Einmalpipetten	2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Falcon [™] Röhrchen	5 ml Rundboden, 12 x 75 mm	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Objektträger	Kova [®] -Objektträger 10	Hycor Biochemical GmbH, Kassel
Pipettenspitzen	10 µl, 100 µl, 1000 µl	Peske, Aindlingen-Arnhofen
Reaktionsgefäß 3810	2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Serumröhrchen S-Monovette [®]	9 ml	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen	15 ml PP, 50 ml PP	TPP AG, Trasadingen, Schweiz

1.3 Chemikalien und Reagenzien

5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyaniniodid (JC-1)	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
FACSFlow™	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Carbonylcyanid-4-trifluoromethoxyphenylhydrazon (FCCP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO) ≥ 99,5 %ig	
Dulbecco's PBS (1x) ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ (DPBS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Ethanol, 96 %ig	Merck KGaA, Darmstadt
Biocoll/Ficoll Separating Solution	Biochrom AG, Berlin
fetales Kälberserum	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Penicillin/Streptomycin	
RPMI 1640 mit L-Glutamin	
Triacetyluridin	Quasana GmbH, Bad Soden

Nährmedium für die Zellfärbung (Supplementiertes RPMI 1640):

100 ml RPMI 1640 mit L-Glutamin (300 mg/l)
1 ml Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (10 mg/ml)
5 ml fetales Kälberserum

JC-1 Stocklösung:

2 mg JC-1, gelöst in 1 ml Dimethylsulfoxid (DMSO)

1.4 Software

CELLQuest™ Version 3.1	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Microsoft® Office Excel 2003	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Microsoft® Office Word 2003	
SPSS® Version 13.0	SPSS GmbH, München

2. Methoden

2.1 Gewinnung von peripheren mononukleären Blutzellen aus Vollblut

2.1.1 Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll

Die Zellen des Vollbluts können aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte durch die Dichtegradientenzentrifugation über Ficoll aufgetrennt werden. Ficoll ist eine hydrophile Polysaccharoselösung, die mit 1,077 g/ml eine höhere Dichte als Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten aufweist. Diese Dichte ist jedoch geringer als die von Erythrozyten und Granulozyten. Zur Separation wird die Ficoll-Lösung in ein Röhrchen pipettiert und mit Vollblut überschichtet. Die Zentrifugation führt aufgrund der spezifischen Eigenschaften von Ficoll zur Ausbildung von Schichten, die verschiedene Zelltypen enthalten. Erythrozyten, Granulozyten und tote Zellen sedimentieren durch die Ficoll-Schicht auf den Boden des Röhrchens. Die mononukleären Blutzellen (PBMC) sammeln sich entsprechend ihrer spezifischen Dichte in einer Schicht zwischen Ficoll und dem Plasma an. Das Plasma enthält die Thrombozyten. Der PBMC-Ring wird vorsichtig abpipettiert und die mononukleären Zellen (Lymphozyten, Monozyten) durch mehrfaches Waschen mit einer Pufferlösung (DPBS) gereinigt (Boyum 1984) (Abbildung 6).

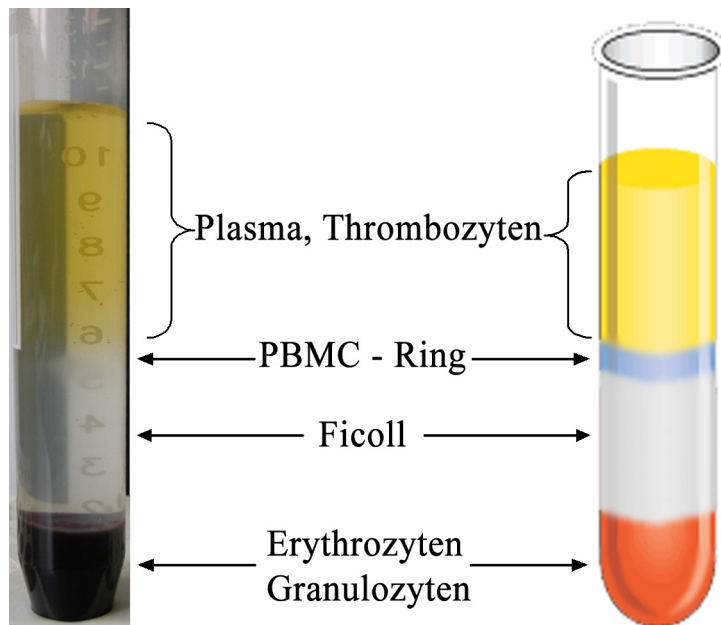


Abbildung 6: Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll

2.1.2 Durchführung der Ficoll-Präparation

Jedem Studienteilnehmer werden aus einer peripheren Vene 9 ml Vollblut entnommen und in einem Serumröhrchen (S-Monovette[®]) langsam 5 min im Mischgerät Reax 2 gedreht. Nach dem Gerinnen des Blutes werden ca. 3 bis 4 ml unkoagulierte Blut, dessen Thrombozytenzahl vermindert ist, in ein Zentrifugenröhrchen (15 ml) gegeben, mit Dulbecco's PBS (1x) ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ (DPBS) auf 10 ml verdünnt und durchgemischt (Banas et al. 2004). In ein weiteres Zentrifugenröhrchen (15 ml) werden 4 ml Ficoll-Trennlösung pipettiert. Anschließend schichtet man die Blut-DPBS-Mischung vorsichtig auf die Ficoll-Trennlösung. Eine Vermischung der Phasen ist unbedingt zu vermeiden. Nun wird das Röhrchen bei Raumtemperatur 20 min bei 1500 U/min ohne Bremse zentrifugiert. Dabei werden die einzelnen Zellbestandteile des peripheren Blutes in Abhängigkeit von ihrer Dichte in Schichten aufgetrennt.

Der so gewonnene PBMC-Ring (ca. 2 ml) wird nach dem Absaugen des Plasmaanteils vorsichtig abgenommen. Um ein möglichst reines PBMC-Pellet zu erhalten und die nichtmononukleären Zellen zu entfernen, werden die PBMCs zweimal mit 8 ml DPBS-Lösung 5 min bei Raumtemperatur bei 1000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird jeweils abgesaugt.

2.2 Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials mit dem JC-1-Assay

2.2.1 Grundlagen des JC-1-Assays

Das mitochondriale Membranpotential kann mit Fluoreszenzfarbstoffen experimentell bestimmt werden. Dazu eignet sich besonders der kationische Farbstoff 5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyaniniodid (JC-1) (Abbildung 7). JC-1 dringt in die Mitochondrien ein und liegt bei einem niedrigen MMP in geringer Konzentration als grün fluoreszierende, monomere Form mit einer Emission von Licht der Wellenlänge 530 nm vor. Bei einem hohen Membranpotential bildet JC-1 rot fluoreszierende J-Aggregate, die Licht der Wellenlänge 590 nm emittieren (Abbildung 8). Die Anregungswellenlänge liegt bei 488 nm. Kommt es z.B. durch eine Verminderung des mitochondrialen Stoffwechsels oder durch die Apoptose zu einer Erniedrigung des mitochondrialen Membranpotentials, verschiebt sich die Fluoreszenzemission vom roten in den grünen Bereich. Das MMP und damit der Zustand des Mitochondriums kann somit durch das Verhältnis von roter (Fluoreszenzkanal FL2) zu grüner (Fluoreszenzkanal FL1)

Fluoreszenzintensität im FACS-Gerät (FACS, Fluorescence Activated Cell Sorting) gemessen werden (Reers et al. 1991; Cossarizza et al. 1993; Salvioli et al. 1997; Shapiro 2000).

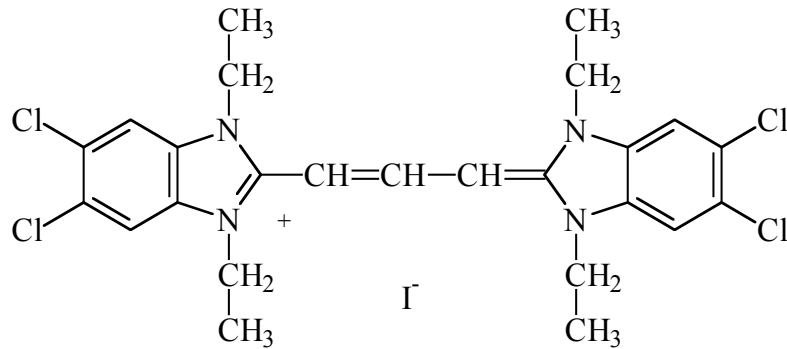


Abbildung 7: Strukturformel von JC-1

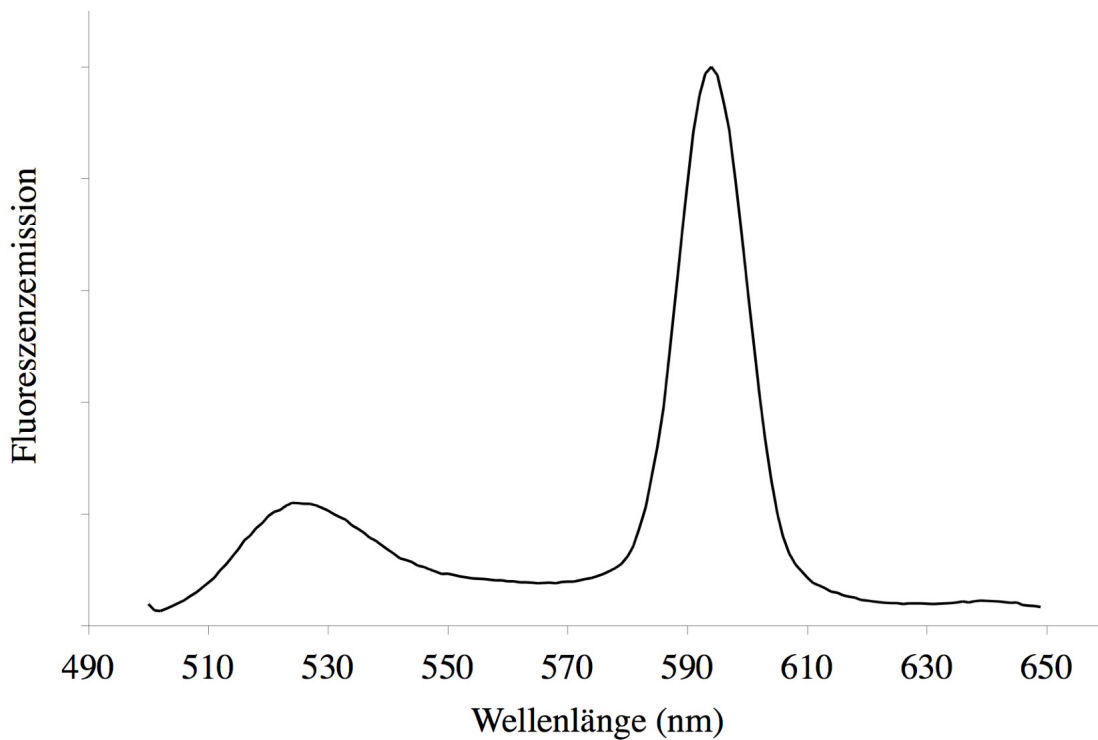


Abbildung 8: Emissionsspektrum von JC-1 bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 488 nm

Der JC-1-Assay hat sich als sehr geeignet für die Messung des MMPs erwiesen (Salvioli et al. 1997; Griffiths 2000; Cossarizza und Moyle 2004). Die Bestimmung des MMPs von

PBMCs wurde deshalb auch in dieser Arbeit mit dem JC-1-Assay durchgeführt. Als Positivkontrolle wird das Protonophor Carbonylcyanid-4-trifluoromethoxyphenylhydrazon (FCCP) eingesetzt (Sarkar et al. 2003; Verhoeven et al. 2005). FCCP erhöht den Protoneneinstrom in die Mitochondrien und führt zu einer vollständigen Depolarisation. Die Ergebnisse der Messungen mit dem JC-1-Assay nach Zugabe von FCCP werden zu denen ohne Zugabe dieses mitochondrialen Entkopplers in Relation gesetzt. Damit werden Einflüsse minimiert, die die Ergebnisse verfälschen könnten (Griffiths 2000).

2.2.2 Durchführung der JC-1-Färbung

Das gereinigte PBMC-Zellpellet aus der Ficoll-Präparation wird mit 1 ml Supplementiertem RPMI 1640 gemischt. Ca. 5 µl der Lösung werden in eine Zählkammer übertragen und die Anzahl der Zellen bestimmt. Falls nötig wird weiter Supplementiertes RPMI 1640 zugegeben, bis eine Konzentration von 1 Million Zellen pro Milliliter vorliegt. Je 1 ml der Suspension aus PBMCs und Supplementiertem RPMI 1640 wird in 2 FACS-Röhrchen gegeben und jeweils mit 5 µl einer 3,08 mM JC-1-Lösung gefärbt, so dass das JC-1 nach dem Vermischen in einer Konzentration von 15,4 µmol/l (10 µg/ml) vorliegt. Die gefärbten Zellen werden nun 15 min bei 37 °C und 5 %igem CO₂-Gehalt im Dunkeln inkubiert. Anschließend transferiert man bei Raumtemperatur jeweils die Hälfte (500 µl) der aufgewirbelten Zellsuspension in zwei weitere FACS-Röhrchen und zentrifugiert alle vier Röhrchen bei 900 U/min 3 min lang ohne Bremse. Der Überstand wird abgesaugt. Das jeweilige Zellpellet wird in 500 µl DPBS resuspendiert und noch zweimal gewaschen. Nach der Reinigung werden die gefärbten Zellen in 400 µl DPBS resuspendiert und stehen für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

2.3 Zelluntersuchungen mit der Durchflusszytometrie

2.3.1 Theoretische Grundlagen der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht das Zählen und die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Zellen, die in einem Flüssigkeitsstrom durch einen Lichtstrahl treten. Eine wichtige Anwendung besteht in der Analyse bestimmter Eigenschaften von Zellen, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert wurden. Die Zellen passieren in einem Flüssigkeitsstrom hydrodynamisch fokussiert nacheinander einen Laserstrahl. Dabei werden die Farbstoffe durch den Laser zur Emission von

Fluoreszenzlicht angeregt, woraus verschiedene Eigenschaften der Zellen abgeleitet werden können. Auch eine Sortierung der Zellen ist möglich. Zusätzlich streuen die Zellen das auftreffende Licht. Auf diese Weise kann die Anzahl der Zellen bestimmt werden. Das in Richtung des Laserstrahls gestreute Licht wird als Vorwärtsstreulicht (FSC, forward scatter) bezeichnet und ist ein Maß für die Zellgröße. Das im rechten Winkel zum Laserstrahl gestreute Seitwärtsstreulicht (SSC, sideward scatter) korreliert mit der Granularität der Zelle und gibt Aufschluss über die Größe und Struktur des Zellkerns. Das Fluoreszenzlicht der verschiedenen Fluorochrome wird durch Teilerspiegel und farbselektive Bandpassfilter in Fluoreszenzspektren aufgetrennt und gelangt auf photosensitive Detektoren, so genannte Photomultiplier. In der Regel stehen drei Sensoren für die Wellenlängen 530 nm (Fluoreszenzkanal FL1), 585 nm (Fluoreszenzkanal FL2) und > 650 nm (Fluoreszenzkanal FL3) zur Verfügung. Die Signale der Photomultiplier werden verstärkt und können im Computer ausgewertet und dargestellt werden. Für die durchflusszytometrische Analyse der PBMCs wurde der FACScan der Firma Becton Dickinson mit einem Argonlaser der Wellenlänge 488 nm verwendet.

2.3.2 Durchführung der Durchflusszytometrie

Nach der Durchführung der JC-1-Färbung liegen von jeder Blutprobe in vier FACS-Röhrchen jeweils in 400 µl DPBS suspendierte PBMCs vor. Die PBMCs in den Röhrchen werden gut aufgewirbelt. Der Inhalt von zwei dieser Röhrchen wird direkt mit dem FACScan untersucht. Die beiden anderen Röhrchen werden als Positivkontrolle 1 min vor Messbeginn mit jeweils 16 µl einer FCCP-Lösung (4 µM in 96 %igem Ethanol) versetzt. Mit dem FACScan werden jeweils 10000 Zellen analysiert.

2.4 Auswertung der Durchflusszytometrie

Die Auswertung der Ergebnisse der Durchflusszytometrie erfolgte mit der Software CELLQuest™. Die gewonnenen Daten werden in zweidimensionalen Histogrammen dargestellt. Um möglichst nur gefärbte PBMCs auszuwerten, werden die gemessenen Zellen in einem Punktehistogramm nach Granularität (SSC) und Zellgröße (FSC) aufgetragen. Auf die PBMC-Population wird ein Gate gelegt (Gate 1, Abbildung 9). Die in diesem Gate eingeschlossenen Zellen werden in Abhängigkeit von ihren Fluoreszenzeigenschaften in ein weiteres Punktehistogramm übertragen. Auf die gut gefärbte PBMC-Population wird ein weiteres Gate gelegt (Gate 2, Abbildung 10). Eine

gesunde Zellpopulation mit einem normalen MMP weist viele Zellen mit einem hohen FL2 und einem niedrigen FL1 auf.

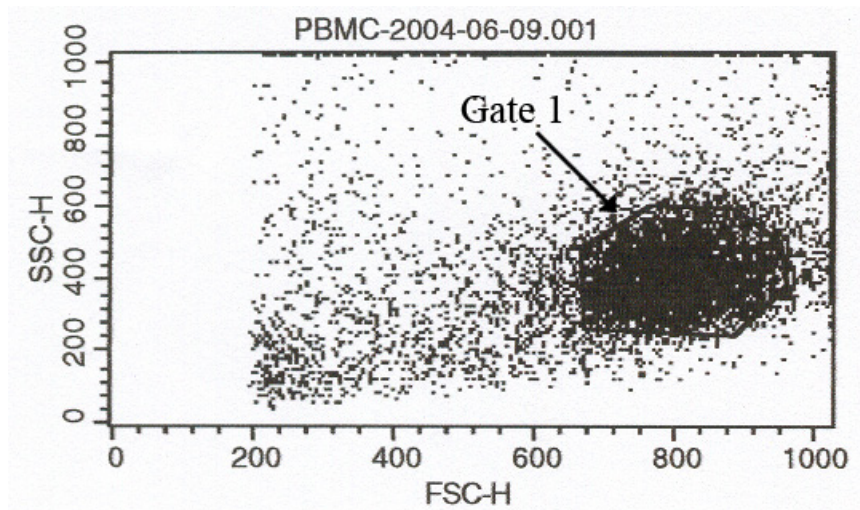


Abbildung 9: Punktehistogramm gefärbter Zellen, aufgetragen nach Granularität (SSC) und Zellgröße (FSC)

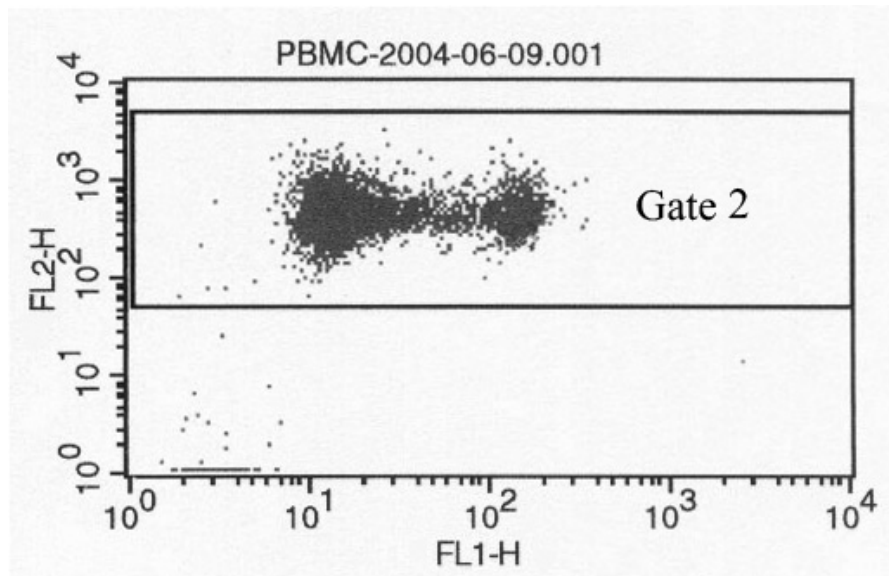


Abbildung 10: Punktehistogramm gefärbter Zellen, aufgetragen nach Fluoreszenzeigenschaften in FL2 (rot) und in FL1 (grün)

Mit CELLQuest™ wird der Median der Fluoreszenzkanäle FL1 (grün) und FL2 (rot) berechnet. Die Berechnung des MMPs ergibt sich aus dem Vergleich der Fluoreszenzeigenschaften der PBMCs ohne und mit FCCP. Man erhält sowohl für die Messung ohne als auch mit FCCP einen Quotienten aus FL2 zu FL1. Diese beiden

Quotienten werden ins Verhältnis gesetzt und mit 100 multipliziert. Es ergibt sich als Wert für das MMP:

$$\text{MMP} = \frac{\text{Median FL2 (ohne FCCP)}/\text{Median FL1 (ohne FCCP)}}{\text{Median FL2 (mit FCCP)}/\text{Median FL1 (mit FCCP)}} \cdot 100$$

Das MMP wird als relativer Wert ohne Einheit angegeben.

2.5 Statistische Auswertung

Alle statistischen Auswertungen wurden mit dem Programm SPSS[®] Version 13.0 (SPSS GmbH) durchgeführt. Die statistische Analyse wurde bei mehr als 30 Daten und dem Vorliegen einer Normalverteilung nach dem Kolmogorov-Smirnov-Test mit dem T-Test bei ungepaarten und gepaarten Stichproben durchgeführt. Lag keine Normalverteilung vor oder standen weniger als 30 Daten zur Verfügung, wurde die Signifikanz mit dem Mann-Whitney U Test sowie mit dem Wilcoxon-Test berechnet. Für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde die Varianzanalyse (ANOVA) verwendet und bei signifikanten Unterschieden die Untergruppen mit dem LSD post hoc-Test verglichen. Kategoriale Variablen wurden in Kreuztabellen mit dem Chi-Quadrat-Test analysiert. Die Pearson-Korrelation diente zur Berechnung des Korrelationskoeffizienten und der Signifikanz. Die multivariate Analyse wurde mit einer linearen Regression im Rückwärts-Verfahren durchgeführt. Bei einem p-Wert < 0.05 wurde statistische Signifikanz angenommen.

III. Ergebnisse

1. Charakterisierung der Studienteilnehmer

An der klinischen Studie zur Untersuchung des mitochondrialen Membranpotentials von PBMCs nahmen im Zeitraum von Mai 2004 bis Juli 2005 insgesamt 79 Probanden teil. Die 71 HIV-infizierten Patienten wurden aus dem Patientenkollektiv der Infektionsambulanz und Tagesklinik der Medizinischen Poliklinik des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität München rekrutiert. 8 Mitarbeiter der Infektionsambulanz stellten sich als gesunde Probanden zur Verfügung.

Jeder Studienteilnehmer wurde auf folgende für diese Arbeit relevanten Laborparameter untersucht:

Blutbild, Differentialblutbild, Aspartataminotransferase (AST), Alaninaminotransferase (ALT), γ -Glutamyltransferase (γ -GT), Bilirubin gesamt, Alkalische Phosphatase (aP), Cholesterin, Triglyceride (TG), High-Density-Lipoprotein-Cholesterin (HDL-Cholesterin), Low-Density-Lipoprotein-Cholesterin (LDL-Cholesterin), Laktat, Albumin, Harnstoff, Kreatinin, Creatinkinase (CK), Laktatdehydrogenase (LDH), C-reaktives Protein (CRP), Thromboplastinzeit, Alkohol, Thyreotropin (TSH).

Der Body Mass Index (BMI) wurde mit der Formel Körpergewicht (kg) / Körperlänge² (m²) berechnet.

Alle Patienten wurden im Rahmen einer ärztlichen Untersuchung nach den Symptomen einer Lipodystrophie (Lipoatrophie bzw. Lipohypertrophie) und einer peripheren Polyneuropathie befragt. Die Ergebnisse wurden durch erfahrene Ärzte bestätigt. Ebenso wurde jeder Patient einmalig serologisch auf eine Hepatitis getestet.

Patienten mit einer opportunistischen Infektion wurden von der Studie ausgeschlossen. Bei keinem Studienteilnehmer trat während der Untersuchung eine opportunistische Infektion auf.

Die Studienteilnehmer wurden in drei Gruppen eingeteilt:

- gesunde, HIV-negative Probanden als Kontrollgruppe (Gruppe I)
- HIV-infizierte, antiretroviral therapienaive Patienten (Gruppe II)
- HIV-infizierte, antiretroviral therapierte Patienten (Gruppe III).

III. Ergebnisse

Die Kontrollgruppe (Gruppe I) setzte sich aus 8 gesunden, nicht HIV-infizierten Probanden zusammen. 6 dieser Probanden waren männlich und 2 weiblich. Das Verhältnis von Männern zu Frauen entspricht nahezu dem der Gruppe III.

Das Durchschnittsalter in dieser Gruppe betrug im Mittel 35,4 Jahre mit einer Standardabweichung von 14,5 Jahren. Der Body Mass Index (BMI) war $22,6 \pm 1,8 \text{ kg/m}^2$. Die Messung des MMPs der PBMCs der gesunden Probanden ergab einen Wert von 854 ± 57 .

Die Gruppe II bestand aus 13 HIV-infizierten, antiretroviral therapienaiven Patienten, davon 12 Männer und eine Frau. Diese Geschlechterverteilung entspricht damit nicht dem Verhältnis der HIV-infizierten Männer zu den HIV-infizierten Frauen von 4:1 in Deutschland im Jahre 2005. Das Durchschnittsalter betrug $41,5 \pm 8,2$ Jahre. Der BMI wurde mit $23,4 \pm 7,4 \text{ kg/m}^2$ gemessen. Die HIV-Infektion war durchschnittlich seit $72,2 \pm 86,5$ Monaten bekannt. Als Zeitpunkt der Erstinfektion wurde das Datum des ersten positiven HIV-Testes festgelegt.

Die CD4-Zellzahl betrug zu Beginn der Studie 253 ± 133 Zellen/ μl , der CD4-Nadir 180 ± 110 Zellen/ μl und die HI-Viruslast $100,1 \cdot 10^3 \pm 164,9 \cdot 10^3$ Kopien/ml. Ein Patient litt an einer peripheren Polyneuropathie. Die Hepatitisserologie zeigte bei einem Patienten eine chronische Hepatitis B, bei einem weiteren Patienten eine chronische Hepatitis C. Die Werte für die ALT und die AST lagen bei diesen beiden Patienten jedoch im Normbereich. Die Patienten dieser Gruppe wiesen gegenüber den gesunden Probanden einen signifikant niedrigeren HDL-Cholesteringehalt auf ($p = 0,002$).

Die Messung des MMPs der PBMCs der HIV-infizierten, antiretroviral therapienaiven Patienten ergab einen Wert von 646 ± 116 .

Gruppe III setzte sich aus 58 HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten zusammen. Davon waren 43 männlich und 15 weiblich. Diese Geschlechterverteilung entspricht relativ gut der epidemiologischen Geschlechterverteilung der HIV-Infizierten in Deutschland. Das Durchschnittsalter betrug $46,6 \pm 10,7$ Jahre, der BMI $24,1 \pm 3,4 \text{ kg/m}^2$. Damit waren die Patienten dieser Gruppe signifikant jünger als die gesunden Probanden ($p = 0,01$). Die Patienten waren im Durchschnitt vor $146,9 \pm 61,1$ Monaten HIV-positiv

getestet worden. Die Gesamttherapiedauer betrug durchschnittlich $87,2 \pm 45,4$ Monate, die Dauer der aktuellen antiretroviralen Therapie $30,2 \pm 33,2$ Monate. Die CD4-Zellzahl betrug 467 ± 225 Zellen/ μ l. 44 der 58 HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten wiesen eine Viruslast ≤ 50 Kopien/ml auf. Für die statistischen Berechnungen wurde für diese 44 Patienten ein Wert von 50 Kopien/ml angenommen. Die Viruslast ergab deshalb bei den 58 HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten einen Wert von $2,7 \cdot 10^3 \pm 12,5 \cdot 10^3$ Kopien/ml und war damit gegenüber der Viruslast der HIV-infizierten, antiretroviral therapienaiven Patienten signifikant erniedrigt ($p < 0,001$). Die HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten unterschieden sich von den gesunden Probanden durch einen erhöhten Cholesteringehalt ($p = 0,01$), ein erniedrigtes HDL-Cholesterin ($p = 0,002$) und einen erhöhten TG-Gehalt ($p = 0,001$) in signifikanter Weise.

27 Patienten dieser Gruppe gaben in der Anamnese die Symptome einer peripheren Polyneuropathie und 33 Patienten die einer Lipodystrophie an. Diese Erkrankungen traten bei den HIV-negativen Probanden nicht auf. Die Hepatitisserologie zeigte bei 4 Patienten eine chronische Hepatitis B, bei 4 weiteren Patienten eine chronische Hepatitis C. Die AST war bei allen 8 Patienten mit einer chronischen Hepatitis B oder Hepatitis C erhöht. Mit einer Ausnahme war auch die ALT im Vergleich zu Patienten dieser Gruppe erhöht, die nicht an einer Hepatitis erkrankt waren. Die HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten der Gruppe III unterschieden sich in mehreren Kriterien signifikant von den HIV-infizierten, antiretroviral therapienaiven Patienten der Gruppe II: Die Dauer der HIV-Infektion war länger ($p = 0,01$), die CD4-Zellzahl höher ($p < 0,001$), die Viruslast geringer ($p < 0,001$), der Hämoglobinwert ($p = 0,01$), der Cholesteringehalt ($p < 0,001$) und der TG-Gehalt ($p < 0,001$) erhöht. Die Patienten der Gruppe III gaben signifikant häufiger Beschwerden in Form einer peripheren Polyneuropathie ($p = 0,011$) oder einer Lipodystrophie ($p < 0,001$) im Vergleich zu den Patienten der Gruppe II an.

Die Messung des MMPs der PBMCs der HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten ergab einen Wert von 695 ± 71 .

Sämtliche Ergebnisse der Untersuchungen bei gesunden Probanden und HIV-infizierten, antiretroviral therapienaiven und antiretroviral therapierten Patienten sind in Tabelle 2 dargestellt:

III. Ergebnisse

	gesunde, HIV- negative Probanden (Gruppe I) (n = 8)	HIV-infizierte, antiretroviral therapienaive Patienten (Gruppe II) (n = 13)	HIV-infizierte, antiretroviral therapierte Patienten (Gruppe III) (n = 58)
Alter (Jahre) (min-max)	35,4 ± 14,5 (21-64) *	41,5 ± 8,2 (29-56)	46,6 ± 10,7 (24-73)
männlich/weiblich	6/2	12/1	43/15
BMI (kg/m ²)	22,6 ± 1,8	23,4 ± 7,4	24,1 ± 3,4
HIV-Infektion (Monate) (min-max)	-	72,2 ± 86,5 (0-239) *	146,9 ± 61,1 (4-264)
Laborwerte:			
CD4-Zellzahl (Zellen/μl) (min-max)	600-980 §	253 ± 133 (14-460) *	467 ± 225 (58-1071)
CD4-Zellzahl (%) (min-max)	43-54 §	17,1 ± 7,2 (8-33) *	24,6 ± 10,0 (4-49)
CD4-Nadir (Zellen/μl) (min-max)	-	180 ± 110 (1-371)	185 ± 148 (4-616) §
HIV-RNA (10 ³ Kopien/ml)	-	100,1 ± 164,9 *	2,7 ± 12,5
HIV-RNA, ≤ 50 Kopien/ml	-	0/13	44/58
Hämoglobin (g/dl)	14,4 ± 1,3	13,6 ± 1,7 *	14,8 ± 1,4
Leukozyten (10 ³ Zellen/μl)	6,4 ± 1,8	4,7 ± 2,3	5,8 ± 2,0
Laktat (mmol/l)	1,00 ± 0,23	1,23 ± 0,56	1,48 ± 0,75
Cholesterin (mg/dl)	179,38 ± 24,62 *	160,15 ± 22,11 *	211,86 ± 54,37
HDL-Cholesterin (mg/dl)	61,75 ± 23,01 # *	35,62 ± 10,24	43,02 ± 14,32
LDL-Cholesterin (mg/dl)	100 ± 22,32	105,46 ± 16,08	119,04 ± 43,87
TG (mg/dl)	89 ± 20,32 *	94,46 ± 34,19 *	273,55 ± 283,57
ALT/GPT (U/l)	24,86 ± 7,85	34,92 ± 24,79	38,22 ± 27,78
AST/GOT (U/l)	24,00 ± 5,89	30,46 ± 12,64	36,67 ± 20,80
Nebenwirkungen:			
periphere Poly- neuropathie	0/8 *	1/13 *	27/58
Lipodystrophie	0/8 *	0/13 *	33/58

	gesunde, HIV- negative Probanden (Gruppe I) (n = 8)	HIV-infizierte, antiretroviral therapienaive Patienten (Gruppe II) (n = 13)	HIV-infizierte, antiretroviral therapierte Patienten (Gruppe III) (n = 58)
Gesamttherapiedauer (Monate)	-	-	87,2 ± 45,4
Dauer der aktuellen Therapie (Monate)	-	-	30,2 ± 33,2
aktuelle Therapie mit Didanosin und/oder Stavudin	-	-	20/58
Dauer der aktuellen Therapie mit Didanosin und/oder Stavudin (Monate)	-	-	13,9 ± 30,3
hepatitisserologische Untersuchungen:			
chronische Hepatitis B	0/8	1/13	4/57
chronische Hepatitis C	0/8	1/13	4/57
mitochondriales Membranpotential (min-max)	854 ± 57 (795-974) # *	646 ± 116 (503-858)	695 ± 71 (547-866)
#	p < 0,05 vs. HIV-infizierte, antiretroviral therapienaive Patienten		
*	p < 0,05 vs. HIV-infizierte, antiretroviral therapierte Patienten		
\$	bei 49 von 58 Patienten gemessen		
§	nach Neumeister und Brückel 2003		

Tabelle 2: Untersuchungsergebnisse in den Gruppen I bis III

2. Gruppen I bis III und mitochondriales Membranpotential

Die Untersuchung des MMPs der PBMCs ergab bei den gesunden Probanden der Gruppe I ein MMP von 854 ± 57 , bei den HIV-infizierten, antiretroviral therapienaiven Patienten der Gruppe II ein MMP von 646 ± 116 und bei den HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten der Gruppe III ein MMP von 695 ± 71 .

Die gesunden Probanden hatten ein signifikant höheres MMP als die HIV-infizierten, antiretroviral therapienaiven Patienten ($p < 0,001$) und als die HIV-infizierten, antiretroviral

III. Ergebnisse

therapierten Patienten ($p < 0,001$). Das MMP der HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten war im Vergleich zu dem MMP der HIV-infizierten, antiretroviral therapienaiven Patienten leicht, jedoch nicht signifikant erhöht ($p = 0,165$) (Abbildung 11). Wird das MMP der PBMCs der gesunden Probanden als 100 % angesetzt, ergibt sich daraus für die HIV-infizierten, therapienaiven Patienten eine Verringerung des MMPs auf 75,6 %. Bei den HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten ist dieser Wert wieder leicht auf 81,7 % erhöht.

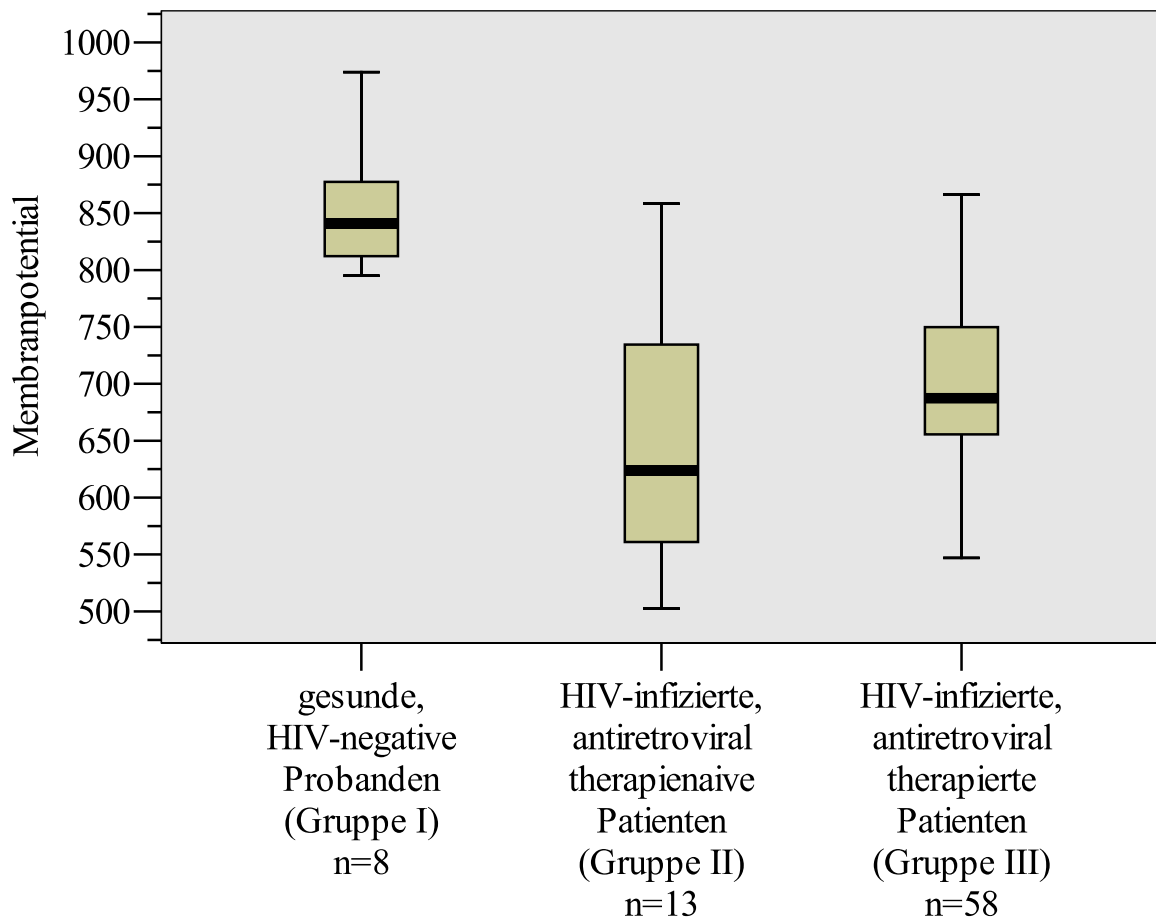


Abbildung 11: Mitochondriales Membranpotential in den Gruppen I bis III (Boxplot-Darstellung)

3. Laborwerte und mitochondriales Membranpotential

3.1 CD4-Zellzahl und mitochondriales Membranpotential

Bei allen 71 HIV-infizierten Patienten zeigte sich eine hoch signifikante Pearson-Korrelation der CD4-Zellzahl mit dem MMP der PBMCs ($r = 0,326$; $p = 0,005$), dargestellt in Abbildung 12 unter Mitverwendung einer Regressionslinie.

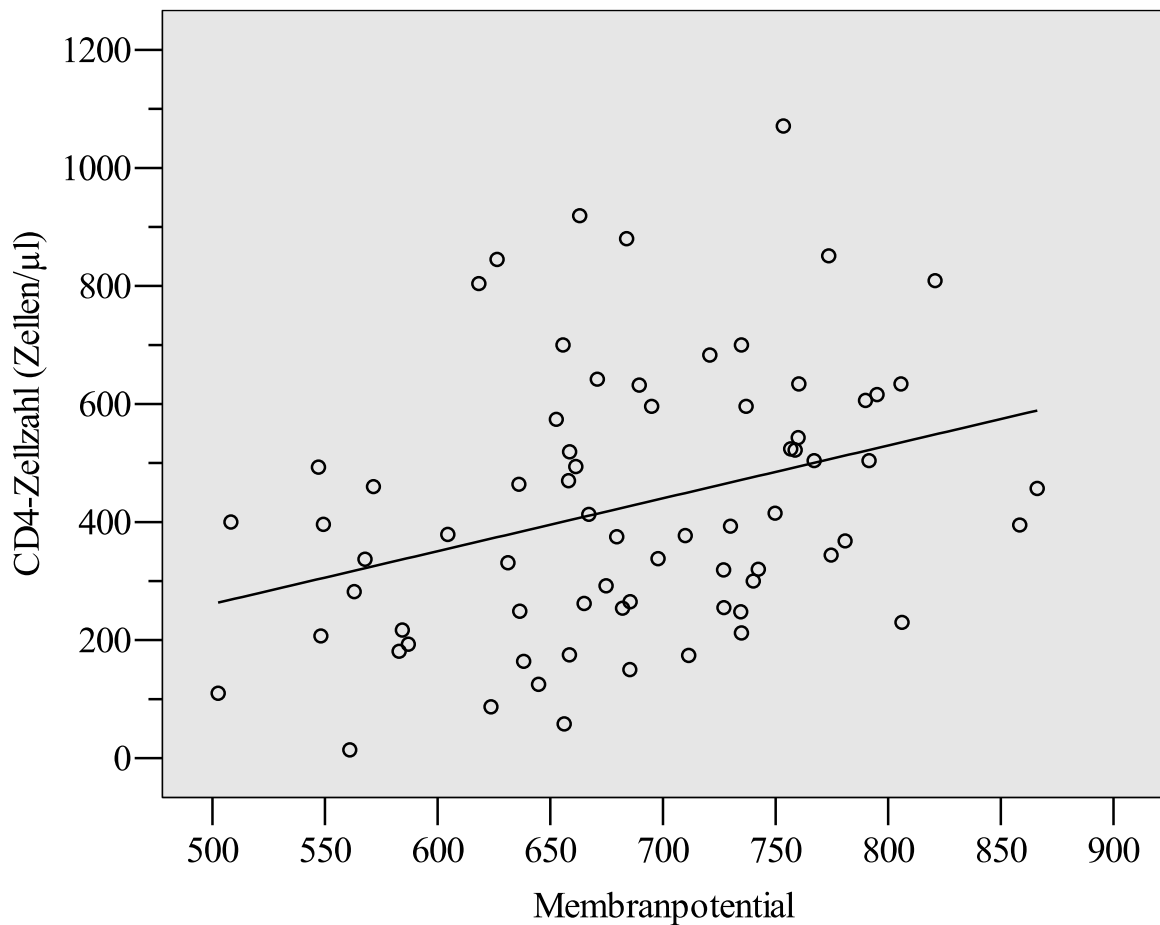


Abbildung 12: Korrelation des mitochondrialen Membranpotentials mit der CD4-Zellzahl bei allen 71 HIV-infizierten Patienten

In der Gruppe II der HIV-infizierten, antiretroviral therapienaiven Patienten konnte keine Korrelation zwischen der CD4-Zellzahl und dem MMP der PBMCs nachgewiesen werden ($r = 0,291$; $p = 0,334$). Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die n-Zahl der Patienten dieser Gruppe relativ klein ist.

Bei den 58 HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten der Gruppe III besteht eine Korrelation zwischen der CD4-Zellzahl und dem MMP der PBMCs ($r = 0,286$; $p = 0,03$) (Abbildung 13).

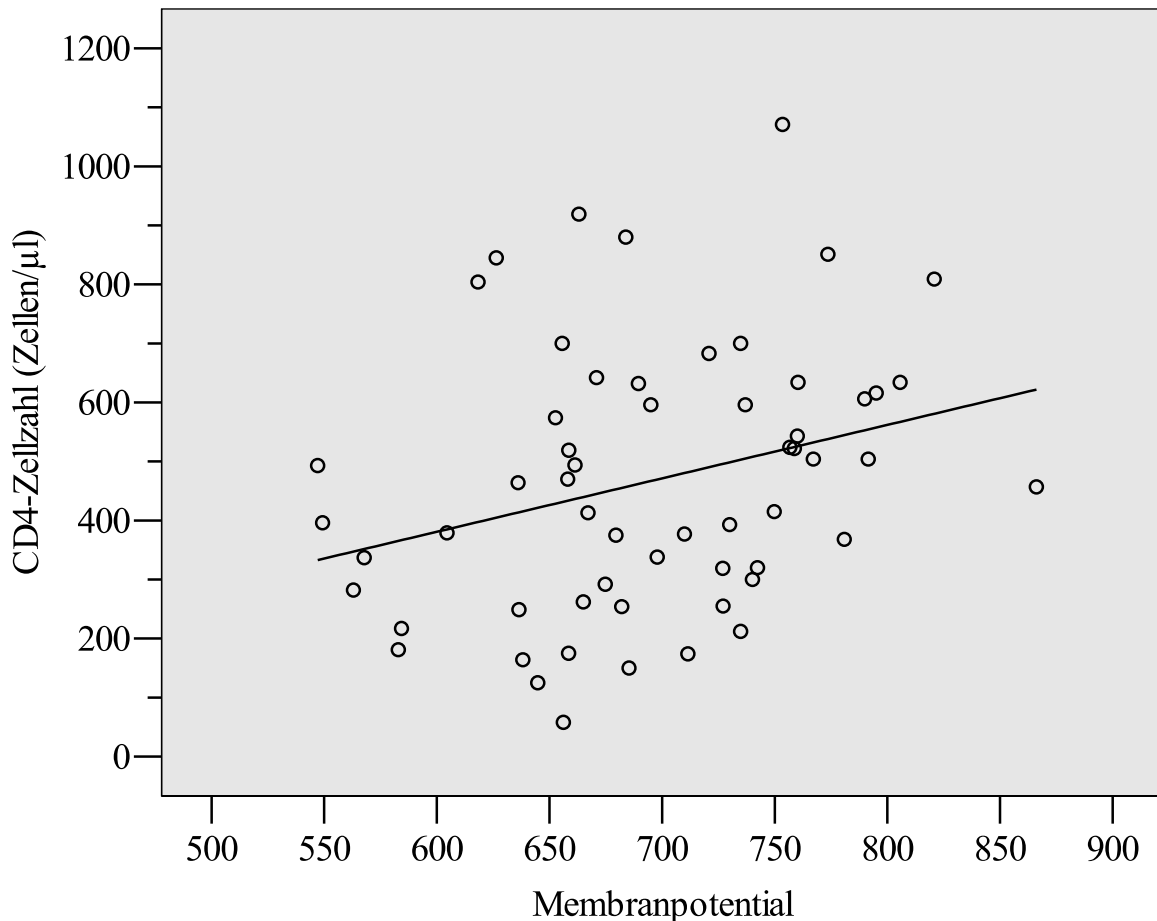


Abbildung 13: Korrelation des mitochondrialen Membranpotentials mit der CD4-Zellzahl bei den 58 HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten

Unterteilt man die HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten in Abhängigkeit von der CD4-Zellzahl nochmals in drei Gruppen, Gruppe 1 mit einer CD4-Zellzahl < 200 Zellen/ μl , Gruppe 2 mit einer CD4-Zellzahl von $200 - 499$ Zellen/ μl , und Gruppe 3 mit einer CD4-Zellzahl ≥ 500 Zellen/ μl , so ergibt sich für die Gruppe 1 ein MMP von 654 ± 40 , für die Gruppe 2 ein MMP von 676 ± 77 und für die Gruppe 3 ein MMP der PBMCs von 726 ± 60 . Untersuchungen mit der Varianzanalyse zeigten ein Signifikanzlevel von $p = 0,01$. Der LSD post hoc-Test ergab keine Signifikanz der MMPs zwischen Gruppe 1 und Gruppe 2 ($p = 0,434$), aber ein signifikant höheres MMP der Gruppe 3, sowohl im Vergleich zu Gruppe 1 ($p = 0,015$) als auch zu Gruppe 2 ($p = 0,011$) (Abbildung 14).

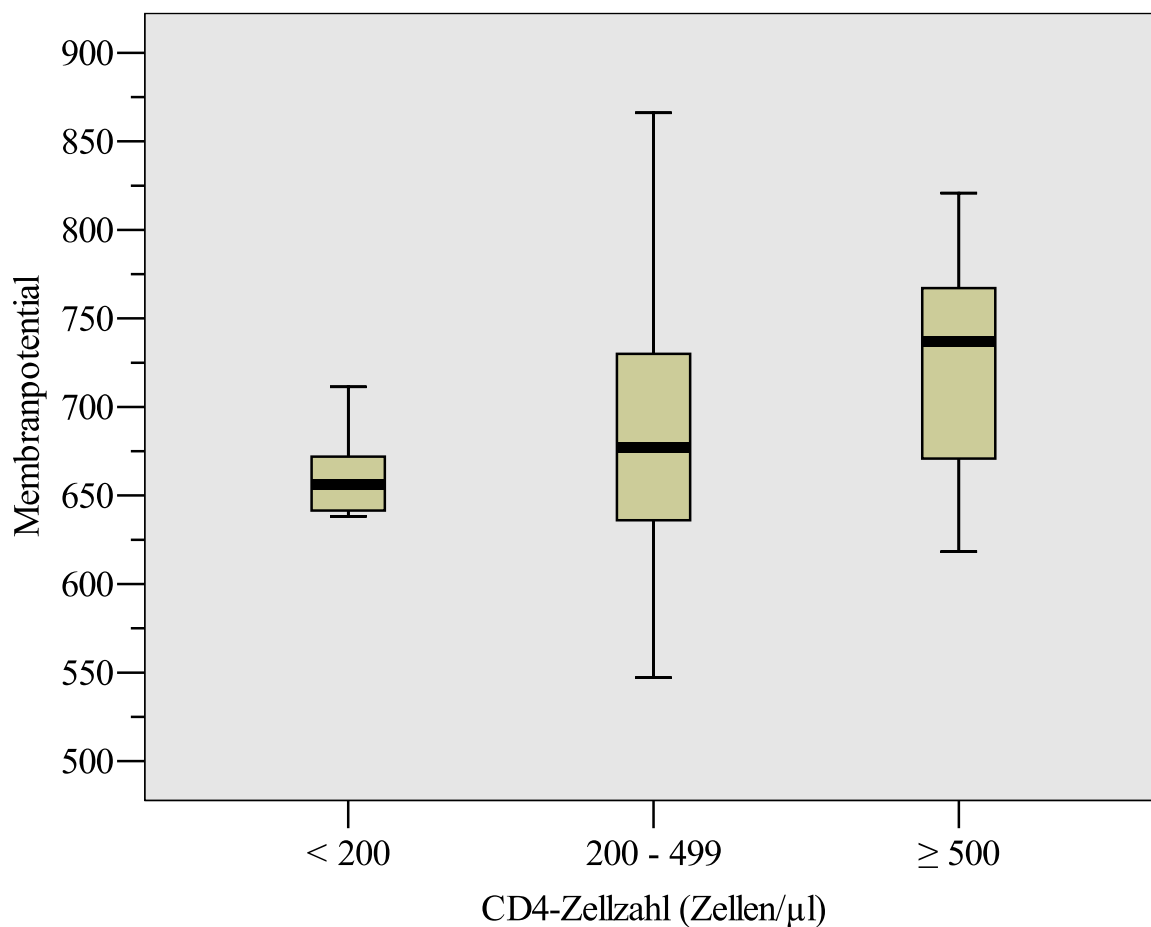


Abbildung 14: Zusammenhang des mitochondrialen Membranpotentials mit der CD4-Zellzahl bei den 58 HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten (Boxplot-Darstellung)

3.2 CD4-Nadir und mitochondriales Membranpotential

Der CD4-Nadir ist die geringste beim Patienten jemals gemessene CD4-Zellzahl. Er konnte bei allen HIV-infizierten, antiretroviral therapienaiven Patienten ermittelt werden und zeigte eine hoch signifikante lineare Korrelation mit dem MMP der PBMCs ($r = 0,767$; $p = 0,002$) (Abbildung 15).

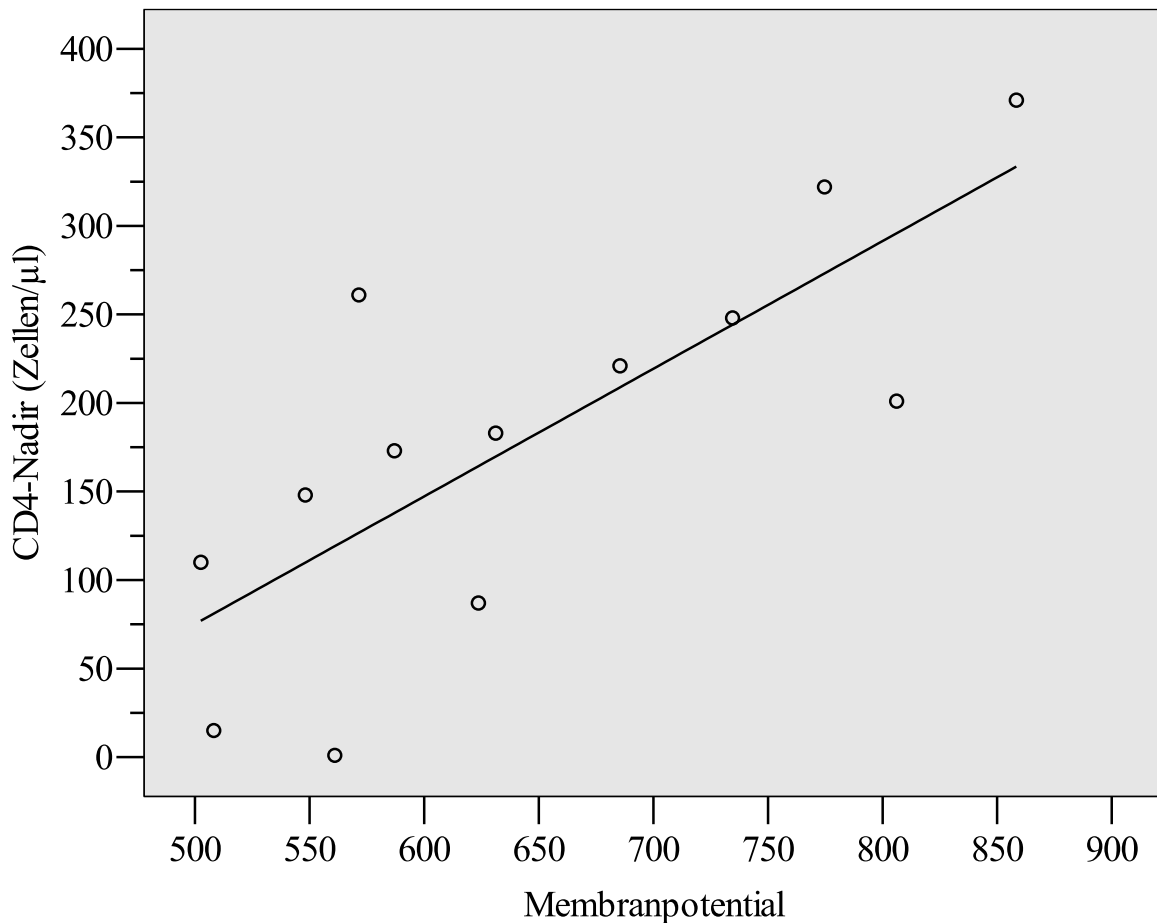


Abbildung 15: Korrelation des mitochondrialen Membranpotentials mit dem CD4-Nadir bei den 13 HIV-infizierten, antiretroviral therapienaiven Patienten

Die HIV-infizierten, therapienaiven Patienten wurden in eine Gruppe mit einem niedrigen CD4-Nadir (< 150 Zellen/ μl) mit dem MMP von 549 ± 49 , eine Gruppe mit einem mittleren CD4-Nadir ($150 - 300$ Zellen/ μl) mit dem MMP von 669 ± 91 , und eine Gruppe mit einem hohen CD4-Nadir (> 300 Zellen/ μl) mit dem MMP der PBMCs von 817 ± 59 unterteilt. Bei der Varianzanalyse zeigte sich eine Signifikanz von $p = 0,004$. Die Untersuchung dieser Gruppen mit dem LSD post hoc-Test ergab ein signifikant höheres MMP bei einem hohen CD4-Nadir im Vergleich zu dem MMP bei einem mittleren ($p = 0,034$) bzw. einem niedrigen CD4-Nadir ($p = 0,001$). Patienten mit einem mittleren CD4-Nadir wiesen ebenfalls ein signifikant höheres MMP ihrer PBMCs im Vergleich zu dem MMP bei Patienten mit einem niedrigen CD4-Nadir auf ($p = 0,022$) (Abbildung 16).

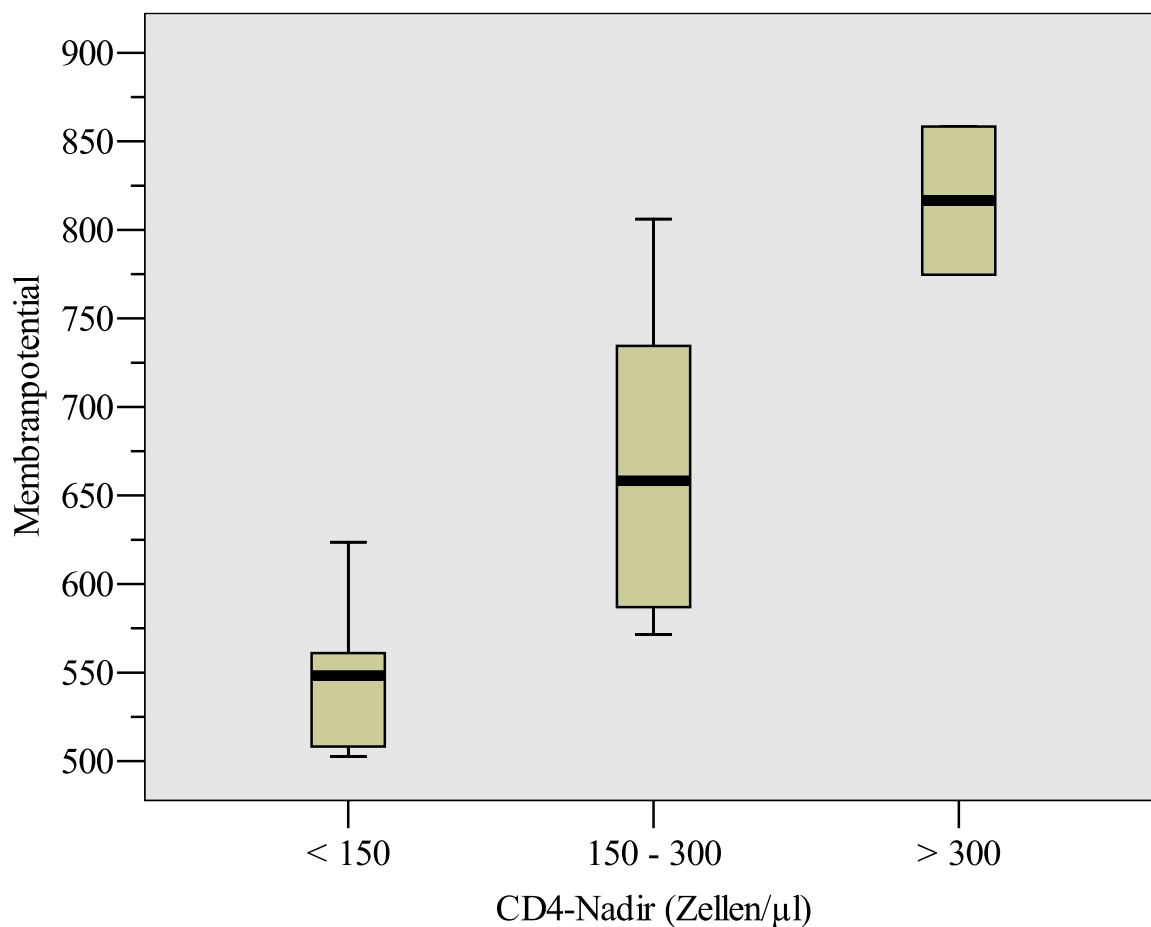


Abbildung 16: Zusammenhang des mitochondrialen Membranpotentials mit dem CD4-Nadir bei den 13 HIV-infizierten, therapienaiven Patienten (Boxplot-Darstellung)

In der Gruppe der HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten wurde der CD4-Nadir nur bei 49 der 58 Patienten dokumentiert. Bei den HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten konnte kein Zusammenhang zwischen dem CD4-Nadir und dem MMP der PBMCs festgestellt werden.

3.3 Viruslast und mitochondriales Membranpotential

Bei den HIV-infizierten, antiretroviral therapienaiven Patienten korrelierte die Höhe der Viruslast signifikant negativ mit dem MMP ($r = -0,599$; $p = 0,03$). Eine Erhöhung der Viruslast geht mit einer Reduktion des MMPs der PBMCs einher (Abbildung 17).

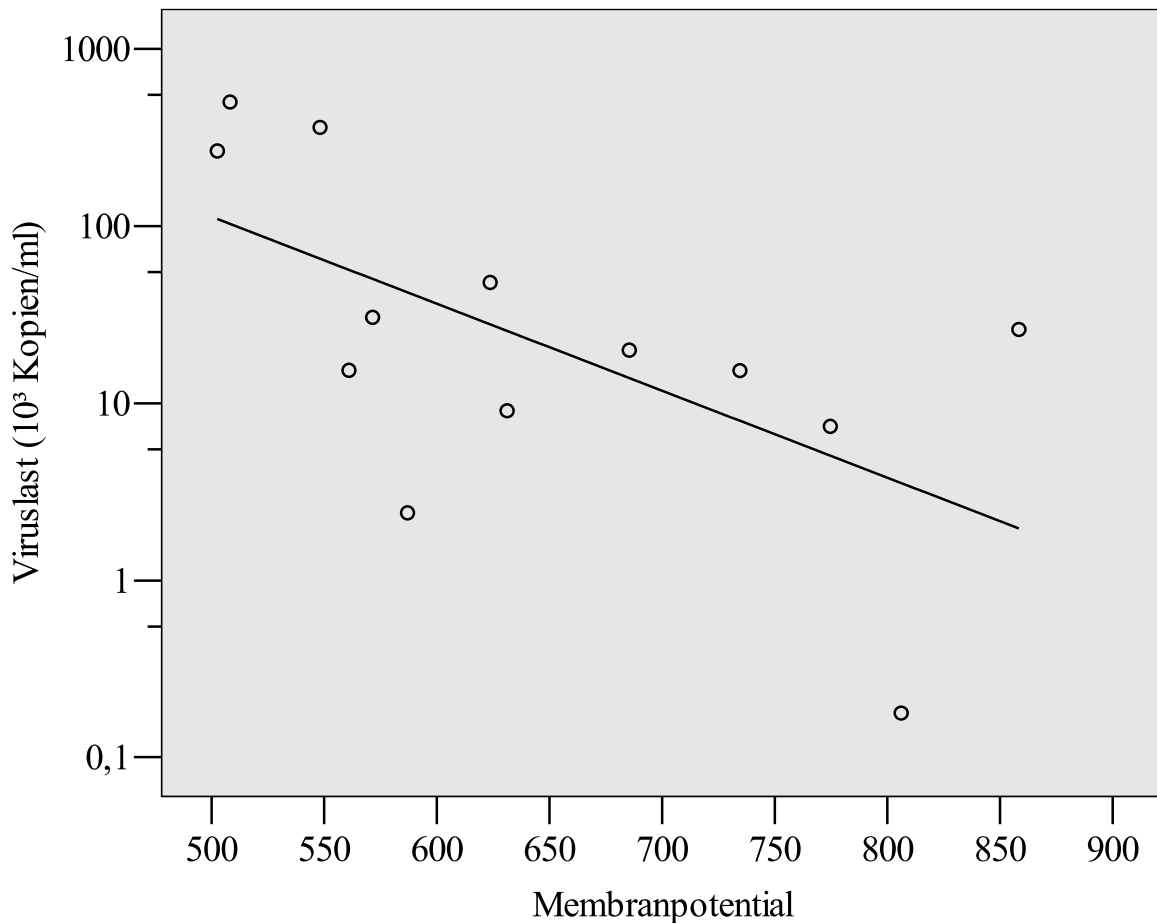


Abbildung 17: Korrelation des mitochondrialen Membranpotentials mit der Viruslast bei den 13 HIV-infizierten, antiretroviral therapienaiven Patienten (halblogarithmische Darstellung)

Die Untersuchung der HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten ergab keine Korrelation der Viruslast mit dem MMP der PBMCs. Werden die HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten mit einer Viruslast ≤ 50 Kopien/ml nicht berücksichtigt, ist eine Linearität der Viruslast mit dem MMP ebenfalls nicht nachweisbar.

Die 58 HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten, einschließlich der Patienten mit einer Viruslast ≤ 50 Kopien/ml, wiesen mit $2,7 \cdot 10^3 \pm 12,5 \cdot 10^3$ Kopien/ml eine signifikant erniedrigte Viruslast im Vergleich zu den HIV-infizierten, antiretroviral therapienaiven Patienten mit $100,1 \cdot 10^3 \pm 164,9 \cdot 10^3$ Kopien/ml auf ($p < 0,001$).

Werden alle 71 HIV-infizierte Patienten betrachtet, korreliert das MMP der PBMCs signifikant mit der Höhe der Viruslast ($r = -0,429$; $p < 0,001$).

3.4 Laktat-Wert und mitochondriales Membranpotential

Der Laktat-Wert der HIV-infizierten, antiretroviral therapienaiven Patienten der Gruppe II unterschied sich mit $1,23 \pm 0,56$ mmol/l nicht signifikant vom Laktat-Wert von $1,00 \pm 0,23$ mmol/l der gesunden Probanden der Gruppe I ($p = 0,595$) bzw. vom Laktat-Wert von $1,48 \pm 0,75$ mmol/l der HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten der Gruppe III ($p = 0,227$). Der Laktat-Wert der HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten war gerade nicht mehr signifikant höher als der Laktat-Wert der gesunden Probanden ($p = 0,062$). In keiner der untersuchten Gruppen korrelierte der Laktat-Wert mit dem MMP der PBMCs. Auch bei den mit Didanosin und/oder Stavudin therapierten Patienten war der Laktat-Wert von $1,54 \pm 0,74$ mmol/l im Vergleich zu dem Laktat-Wert von $1,44 \pm 0,77$ mmol/l bei Patienten, die nicht mit diesen NRTIs behandelt wurden, nicht signifikant erhöht ($p = 0,416$).

4. Antiretrovirale Therapie und mitochondriales Membranpotential

Zur Untersuchung kamen insgesamt 58 HIV-infizierte, antiretroviral therapierte Patienten. Bei den unterschiedlichsten Mehrfachtherapien wurden Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI), Nicht-Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTI) und Proteaseinhibitoren (PI) eingesetzt (Tabelle 3). Die Gesamttherapiedauer betrug im Durchschnitt $87,2 \pm 45,4$ Monate, die Dauer der aktuellen Therapie $30,2 \pm 33,2$ Monate. Sowohl bei der Gesamttherapiedauer ($r = 0,087$; $p = 0,515$) als auch bei der Dauer der aktuellen Therapie ($r = 0,182$; $p = 0,172$) zeigte sich keine Korrelation mit dem MMP der PBMCs.

Von den insgesamt 58 HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten wurden 8 mit Didanosin, 6 mit Stavudin und 6 mit diesen beiden in vitro auf Mitochondrien besonders schädigend wirkenden NRTIs therapiert. Im Mittel betrug die Dauer der aktuellen Therapie mit Didanosin und/oder Stavudin $13,9 \pm 30,3$ Monate. Das MMP der PBMCs von 690 ± 92 bei 8 nur mit Didanosin bzw. das MMP von 729 ± 35 bei 6 nur mit Stavudin therapierten Patienten unterschied sich vom MMP von 695 ± 76 bei den 37 Patienten, die mit anderen NRTIs therapiert wurden, nicht in signifikanter Weise ($p = 0,883$ bzw. $p = 0,282$).

III. Ergebnisse

	Anzahl der jeweils therapierten Patienten
Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren:	57
Abacavir	13
Didanosin	14
Emtricitabin	2
Lamivudin	37
Stavudin	12
Tenofovir	31
Zalcitabin	0
Zidovudin	7
Nicht-Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren:	22
Efavirenz	14
Nevirapin	8
Proteaseinhibitoren:	35
Atazanavir	9
Indinavir	2
Lopinavir/Ritonavir	12
Nelfinavir	6
Ritonavir	15
Saquinavir	9

Tabelle 3: Eingesetzte antiretrovirale Substanzen und Anzahl der mit dem jeweiligen Medikament therapierten Patienten

Der Vergleich zwischen dem MMP von 669 ± 35 bei 6 Patienten, die gleichzeitig mit diesen beiden NRTIs therapiert wurden, mit dem MMP von 695 ± 76 bei den 37 Patienten, die mit NRTIs ohne Didanosin und/oder Stavudin therapiert wurden, ergab eine leichte, jedoch nicht signifikante Verringerung des MMPs der PBMCs ($p = 0,193$).

35 Patienten wurden mit einem Proteaseinhibitor (PI) therapiert. Die Messung des MMPs ihrer PBMCs ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Patienten mit (704 ± 66) und ohne (680 ± 77) PI-Therapie ($p = 0,205$). Außerdem bestand keine Korrelation zwischen der Dauer der aktuellen PI-Therapie und dem MMP ($r = 0,276$; $p = 0,109$).

22 Patienten wurden mit einem Nicht-Nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitor (NNRTI) therapiert. Die Messung des MMPs ihrer PBMCs ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Patienten mit (692 ± 73) und ohne (696 ± 71) NNRTI-Therapie ($p = 0,828$). Es konnte auch keine Korrelation zwischen der Dauer der aktuellen Therapie und dem MMP festgestellt werden ($r = 0,114$; $p = 0,614$).

Bei den übrigen in der Tabelle 3 aufgeführten antiretroviralen Substanzen unterschied sich das MMP der PBMCs der mit dem jeweiligen Inhibitor therapierten Patienten in keinem Fall von dem MMP der Patienten, die nicht mit diesem Inhibitor therapiert wurden.

5. Infektionsdauer und mitochondriales Membranpotential

Bei den antiretroviral therapienaiven Patienten zeigte die Dauer der HIV-Infektion eine signifikante lineare Korrelation mit dem MMP der PBMCs ($r = 0,608$; $p = 0,027$). Eine kurze Infektionsdauer geht mit einem niedrigen MMP einher. Das MMP steigt jedoch mit Zunahme der Infektionsdauer wieder an. In diesem Zusammenhang muss jedoch berücksichtigt werden, dass der tatsächliche Zeitpunkt der Infektion nicht zu ermitteln war und deshalb die Infektionsdauer ab dem Zeitpunkt des ersten positiven HIV-Testes gerechnet wurde.

Bei den HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten ergab sich keine Korrelation zwischen der Infektionsdauer und dem MMP ihrer PBMCs.

6. Lipodystrophie, periphere Polyneuropathie und mitochondriales Membranpotential

33 von 58 HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten wurden im Rahmen einer Untersuchung nach den Symptomen einer Lipodystrophie befragt und die Ergebnisse durch einen erfahrenen Arzt dokumentiert. Die Messung des MMPs der PBMCs ergab keinen signifikanten Unterschied bei Patienten mit Lipodystrophie (690 ± 69) im Vergleich zu Patienten ohne Lipodystrophie (701 ± 74). Bei der Unterteilung der HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten in Patienten mit isolierter Lipodystrophie bzw. isolierter Lipohypertrophie ergab sich im Vergleich zu Patienten ohne die Zeichen einer Lipodystrophie ebenfalls kein signifikanter Unterschied im MMP. Patienten, die länger antiretroviral therapiert wurden, wiesen signifikant häufiger die Symptome einer Lipodystrophie auf ($p = 0,019$). Ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten

einer Lipodystrophie mit den Faktoren Alter, Geschlecht, Infektionsdauer, CD4-Zellzahl, CD4-Nadir, Viruslast, Dauer der aktuellen Therapie und BMI konnte bei den Untersuchungen nicht festgestellt werden.

Das MMP der PBMCs von 27 antiretroviral therapierten Patienten, die an einer peripheren Polyneuropathie litten (703 ± 69), unterschied sich ebenfalls nicht signifikant vom MMP von 31 Patienten ohne die Symptomatik einer peripheren Polyneuropathie (687 ± 73). Ältere ($p = 0,005$), bereits seit längerer Zeit HIV-infizierte ($p < 0,001$), länger antiretroviral ($p = 0,002$) und nicht mit Didanosin und/oder Stavudin therapierte ($p < 0,001$) Patienten litten signifikant häufiger an einer peripheren Polyneuropathie. Zwischen den Faktoren Geschlecht, CD4-Zellzahl, CD4-Nadir, Viruslast, Dauer der aktuellen Therapie und BMI konnte kein signifikanter Zusammenhang mit dem Auftreten einer peripheren Polyneuropathie festgestellt werden.

7. Chronische Hepatitis C-Infektion und mitochondriales Membranpotential

4 von 57 HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten wiesen eine chronische Hepatitis C auf. Das MMP ihrer PBMCs von 651 ± 72 war im Vergleich zu dem MMP von 700 ± 70 der übrigen Patienten dieser Gruppe ohne chronische Hepatitis C zwar erniedrigt, jedoch nicht in signifikanter Weise ($p = 0,194$). Bei den Patienten mit einer chronischen Hepatitis C konnte eine signifikante Erhöhung der AST ($p < 0,001$) festgestellt werden. Die Erhöhung der ALT ($p = 0,134$) war nicht signifikant. Genauere Aussagen über den Zusammenhang des MMPs von PBMCs und einer Koinfektion mit Hepatitis C- und HI-Viren bei therapie-naiven bzw. antiretroviral therapierten Patienten sind aufgrund der kleinen Zahl an untersuchten Patienten nicht möglich.

8. Geschlecht und mitochondriales Membranpotential

Die Gruppe I bestand aus 6 männlichen und 2 weiblichen gesunden Probanden. Das MMP der PBMCs der männlichen Probanden war mit 854 ± 57 gegenüber dem MMP der weiblichen Probanden mit 827 ± 27 etwas erhöht, jedoch nicht signifikant ($p = 0,429$).

In der Gruppe II der HIV-infizierten, therapie-naiven Patienten wiesen die 12 männlichen Studienteilnehmer ein MMP von 657 ± 113 auf. Die Messung des MMPs der PBMCs der einzigen Frau dieser Patientengruppe ergab einen Wert von 502.

In der Gruppe III der HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten betrug das MMP der PBMCs der 43 männlichen Teilnehmer 705 ± 72 und war damit im Vergleich zu dem MMP der 15 weiblichen Teilnehmer mit einem Wert von 666 ± 60 leicht, aber nicht signifikant erhöht ($p = 0,064$). Die weiblichen Teilnehmer waren in dieser Gruppe mit einem Durchschnittsalter von 40,2 Jahren signifikant jünger als die männlichen Teilnehmer mit einem Durchschnittsalter von 48,8 Jahren ($p = 0,002$). Der Anteil an Frauen mit der Symptomatik einer Lipodystrophie war im Vergleich zum Anteil der Männer mit Lipodystrophie leicht, aber nicht signifikant erhöht ($p = 0,067$).

9. Multivariate Analyse

Die multivariate Analyse mit dem MMP als abhängige Variable bezog alle Studienteilnehmer mit ein. Als unabhängige Variable wurden Parameter gewählt, die in der univariaten Analyse signifikant waren. Weitere wichtige klinische Parameter, von denen ein Einfluss auf das MMP angenommen werden kann, flossen ebenfalls in die multivariate Analyse ein. Als feste unabhängige Variable wurde die Gruppenzugehörigkeit (Gruppe I, II oder III) gewählt. Zur Durchführung der multivariaten Analyse wurden verschiedene Modelle herangezogen.

In der Rückwärtsselektion der linearen Regression wurden als unabhängige Variable das MMP, als abhängige Variablen die Gruppenzugehörigkeit, die Dauer der Therapie, das Geschlecht, die CD4-Zellzahl, die Viruslast und die Infektionsdauer gewählt. Die Analyse schloss die Gruppenzugehörigkeit, die Therapie- sowie die Infektionsdauer als nicht signifikant aus. Für eine modellhafte Erklärung eines signifikant niedrigeren MMPs können folgende Faktoren herangezogen werden: eine verringerte CD4-Zellzahl ($p = 0,001$), eine erhöhte Viruslast ($p < 0,001$) und das weibliche Geschlecht ($p = 0,031$) (Tabelle 4).

Folgende Faktoren hatten keinen signifikanten Einfluss auf das MMP der PBMCs: Alter, Infektionsdauer, CD4-Nadir, Art der antiretroviralen Therapie, Dauer der aktuellen Therapie, Therapiedauer mit NRTIs, Dauer der aktuellen Therapie mit Didanosin und/oder Stavudin, Nebenwirkungen wie Lipodystrophie und periphere Polyneuropathie, BMI, Laktat-, Fett- und Leberwerte sowie eine chronische Hepatitis B- oder Hepatitis C-Infektion.

Modell		Koeffizienten (a)				
		Nicht standardisierte Koeffizienten		Standardisierte Koeffizienten		
		B	Standardfehler	Beta	T	Signifikanz
1	(Konstante)	542,129	75,527		7,178	,000
	Gruppenzugehörigkeit	7,341	19,228	,060	,382	,704
	Geschlecht	45,237	19,377	,246	2,335	,023
	Infektionsdauer (Monate)	,109	,161	,095	,672	,504
	CD4-Zellzahl (Zellen/ μ l)	,118	,037	,347	3,203	,002
	Therapiedauer (Monate)	,159	,204	,100	,782	,438
	Viruslast (10^3 Kopien/ml)	-,280	,115	-,290	-2,440	,018
2	(Konstante)	568,196	32,045		17,731	,000
	Geschlecht	43,907	18,920	,239	2,321	,024
	Infektionsdauer (Monate)	,140	,137	,123	1,021	,331
	CD4-Zellzahl (Zellen/ μ l)	,120	,036	,352	3,307	,002
	Therapiedauer (Monate)	,187	,189	,117	,993	,325
	Viruslast (10^3 Kopien/ml)	-,289	,111	-,299	-2,590	,012
3	(Konstante)	574,738	31,356		18,330	,000
	Geschlecht	42,711	18,879	,232	2,262	,027
	Infektionsdauer (Monate)	,191	,128	,167	1,495	,140
	CD4-Zellzahl (Zellen/ μ l)	,127	,036	,370	3,529	,001
	Viruslast (10^3 Kopien/ml)	-,307	,110	-,318	-2,796	,007
4	(Konstante)	604,488	24,476		24,697	,000
	Geschlecht	42,127	19,068	,229	2,209	,031
	CD4-Zellzahl (Zellen/ μ l)	,122	,036	,357	3,381	,001
	Viruslast (10^3 Kopien/ml)	-,375	,101	-,389	-3,711	,000
(a) Abhängige Variable: Membranpotential						

Tabelle 4: Multivariate Analyse aller Studienteilnehmer

10. Kurzzeittherapie und mitochondriales Membranpotential

Bei 6 Patienten der Gruppe II der insgesamt 13 HIV-infizierten, antiretroviral therapienaiven Patienten wurde gemäß den deutsch-österreichischen Leitlinien zur antiretroviralen Therapie der HIV-Infektion mit einer antiretroviralen Therapie begonnen (Arastéh K 2005). Bei diesen 6 Patienten waren die CD4-Zellzahl mit 169 ± 134 Zellen/ μ l ($p = 0,035$), der CD4-Nadir mit 89 ± 70 Zellen/ μ l ($p = 0,001$) und die Infektionsdauer mit

28,8 ± 10,8 Monaten ($p = 0,022$) signifikant niedriger als bei den restlichen 7 Patienten dieser Gruppe. Die Viruslast war mit $198,8 \cdot 10^3 \pm 208,3 \cdot 10^3$ Kopien/ml leicht, jedoch nicht signifikant gegenüber der Viruslast von $15,5 \cdot 10^3 \pm 4,1 \cdot 10^3$ Kopien/ml bei den Patienten erhöht, die nicht einer antiretroviralen Therapie unterzogen wurden. Diese Beobachtungen hängen vermutlich mit der relativ geringen Zahl der untersuchten Patienten zusammen. Zu Beginn der Therapie wiesen diese 6 Patienten mit 555 ± 46 ein signifikant niedrigeres MMP ihrer PBMCs auf als die 7 antiretroviral therapienaiven Patienten dieser Gruppe mit einem MMP von 723 ± 101 ($p = 0,005$).

Die Initialtherapie bestand bei drei Patienten aus einer Kombination von Tenofovir, Lamivudin und Lopinavir/Ritonavir, bei zwei weiteren Patienten aus einer Kombination von Tenofovir, Emtricitabin und Efavirenz. Ein Patient wurde mit Lamivudin, Abacavir und Efavirenz behandelt. Alle untersuchten Patienten wiesen zum Zeitpunkt der Messung des MMPs ihrer PBMCs weder eine chronische Hepatitis B- noch eine Hepatitis C-Infektion auf.

Nach dreimonatiger Therapie zeigte sich bei allen 6 Patienten eine signifikante Verringerung der Viruslast von $198,8 \cdot 10^3 \pm 208,3 \cdot 10^3$ Kopien/ml auf $0,4 \cdot 10^3 \pm 0,8 \cdot 10^3$ Kopien/ml ($p = 0,028$). Bei 2 dieser Patienten sank die Viruslast nach der Kurzzeittherapie auf ≤ 50 Kopien/ml. Für die statistischen Berechnungen wurde für diese beiden Patienten ein Wert von 50 Kopien/ml angenommen. Bei 5 Patienten kam es zu einem Anstieg, bei einem Patienten zu einer Abnahme der CD4-Zellzahl. Insgesamt stieg die durchschnittliche CD4-Zellzahl von 169 ± 134 Zellen/ μ l auf 269 ± 104 Zellen/ μ l an. Die Zunahme ist jedoch nicht signifikant. Der Gehalt an Cholesterin bzw. an LDL-Cholesterin erhöhte sich nach dreimonatiger antiretroviraler Therapie in signifikanter Weise ($p = 0,028$ bzw. $p = 0,028$). Das Erscheinungsbild der Patienten bezüglich einer peripheren Polyneuropathie und einer Lipodystrophie blieb unverändert.

Bei allen 6 antiretroviral therapierten Patienten erhöhte sich das MMP der PBMCs nach dreimonatiger Kurzzeittherapie in signifikanter Weise von 555 ± 46 auf 715 ± 44 ($p = 0,001$) (Abbildung 18, S. 58). Bei linearer Korrelation konnte kein Zusammenhang zwischen dem MMP der PBMCs und der Veränderung der Viruslast, des Cholesteringehaltes und des LDL-Cholesterins festgestellt werden.

Die multivariate Analyse ergab bei einem erhöhten MMP eine signifikante Verringerung der Viruslast ($p = 0,01$) und eine Erhöhung der CD4-Zellzahl ($p = 0,031$). Ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem MMP der PBMCs und weiteren Faktoren wie LDL-

III. Ergebnisse

Cholesterin- und Cholesteringehalt, die sich durch die Therapie signifikant verändert hatten, ist nicht gegeben.

Die 6 HIV-infizierten Patienten aus der Gruppe II wiesen nach dreimonatiger antiretroviraler Therapie im Vergleich zu den 58 HIV-infizierten, langfristig antiretroviral therapierten Patienten der Gruppe III folgende Unterschiede auf: Das MMP war mit 715 ± 44 gegenüber 695 ± 71 nicht signifikant erhöht, die CD4-Zellzahl signifikant niedriger ($p = 0,02$), die Infektionsdauer signifikant kürzer ($p = 0,01$), das LDL-Cholesterin signifikant höher ($p = 0,038$) und sowohl die Gesamttherapiedauer als auch die Dauer der aktuellen Therapie waren signifikant erniedrigt ($p < 0,001$).

Sämtliche Untersuchungsergebnisse der 6 HIV-infizierten Patienten vor und nach der dreimonatigen antiretroviralen Kurzzeittherapie sind in Tabelle 5 dargestellt. Zum Vergleich werden auch die Werte der 58 HIV-infizierten, langfristig antiretroviral therapierten Patienten aufgeführt.

	HIV-infizierte, therapienaive Patienten vor der antiretroviralen Therapie Monat 0 (n = 6)	HIV-infizierte Patienten nach dreimonatiger antiretroviraler Therapie Monat 3 (n = 6)	HIV-infizierte, langzeitig antiretroviral therapierte Patienten (Gruppe III) (n = 58)
Alter (Jahre) (min-max)	$42,2 \pm 9,4$ (29-54)		$46,6 \pm 10,7$ (24-73)
männlich/weiblich	5/1		43/15
BMI (kg/m ²)	$22,5 \pm 10,7$	$26,3 \pm 10,8$	$24,1 \pm 3,4$
HIV-Infektion (Monate) (min-max)	$28,8 \pm 10,8$ (0-167) *		$146,9 \pm 61,1$ (4-264)
Laborwerte:			
CD4-Zellzahl (Zellen/ μ l) (min-max)	169 ± 134 (14-400) *	269 ± 104 (87-368) *	467 ± 225 (58-1071)
CD4-Zellzahl (%) (min-max)	$15,0 \pm 6,0$ (8-25) *	$18,9 \pm 9,0$ (3-27)	$24,6 \pm 10,0$ (4-49)
CD4-Nadir (Zellen/ μ l) (min-max)	89 ± 70 (1-173)		185 ± 148 (4-616) ^s
HIV-RNA (10 ³ Kopien/ml)	$198,8 \pm 208,3$ # *	$0,4 \pm 0,8$	$2,7 \pm 12,5$
HIV-RNA, ≤ 50 Kopien /ml	0/6 # *	2/6	44/58

	HIV-infizierte, therapienaive Patienten vor der antiretroviralen Therapie Monat 0 (n = 6)	HIV-infizierte Patienten nach dreimonatiger antiretroviraler Therapie Monat 3 (n = 6)	HIV-infizierte, langzeitig antiretroviral therapierte Patienten (Gruppe III) (n = 58)
Laktat (mmol/l)	1,32 ± 0,62	1,40 ± 0,74	1,48 ± 0,75
Cholesterin (mg/dl)	168,33 ± 12,74 ^{#*}	232,33 ± 46,19	211,86 ± 54,37
HDL-Cholesterin (mg/dl)	34,17 ± 6,52	38,0 ± 11,35	43,02 ± 14,32
LDL-Cholesterin (mg/dl)	111,67 ± 7,71 [#]	155,83 ± 52,01 [*]	119,04 ± 43,87
TG (mg/dl)	111,67 ± 36,82	192,17 ± 73,55	273,55 ± 283,57
ALT/GPT (U/l)	50,83 ± 29,33	31,67 ± 10,98	38,22 ± 27,78
AST/GOT (U/l)	36,33 ± 16,66	26,50 ± 2,74	36,67 ± 20,80
Nebenwirkungen:			
periphere Poly- neuropathie	1/6	1/6	27/58
Lipodystrophie	0/6	0/6	33/58
Therapie:			
Gesamttherapiedauer (Monate)	-	3 [*]	87,2 ± 45,4
Dauer der aktuellen Therapie (Monate)	-	3 [*]	30,2 ± 33,2
mitochondriales Membranpotential	555 ± 46 ^{#*}	715 ± 44	695 ± 71
[#]	p < 0,05 vs. HIV-infizierte Patienten nach dreimonatiger antiretroviraler Therapie		
[*]	p < 0,05 vs. HIV-infizierte, langfristig antiretroviral therapierte Patienten		
[§]	bei 49 von 58 Patienten gemessen		

Tabelle 5: Untersuchungsergebnisse bei den 6 HIV-infizierten Patienten vor und nach dreimonatiger antiretroviraler Therapie im Vergleich zu den 58 HIV-infizierten, langfristig antiretroviral therapierten Patienten

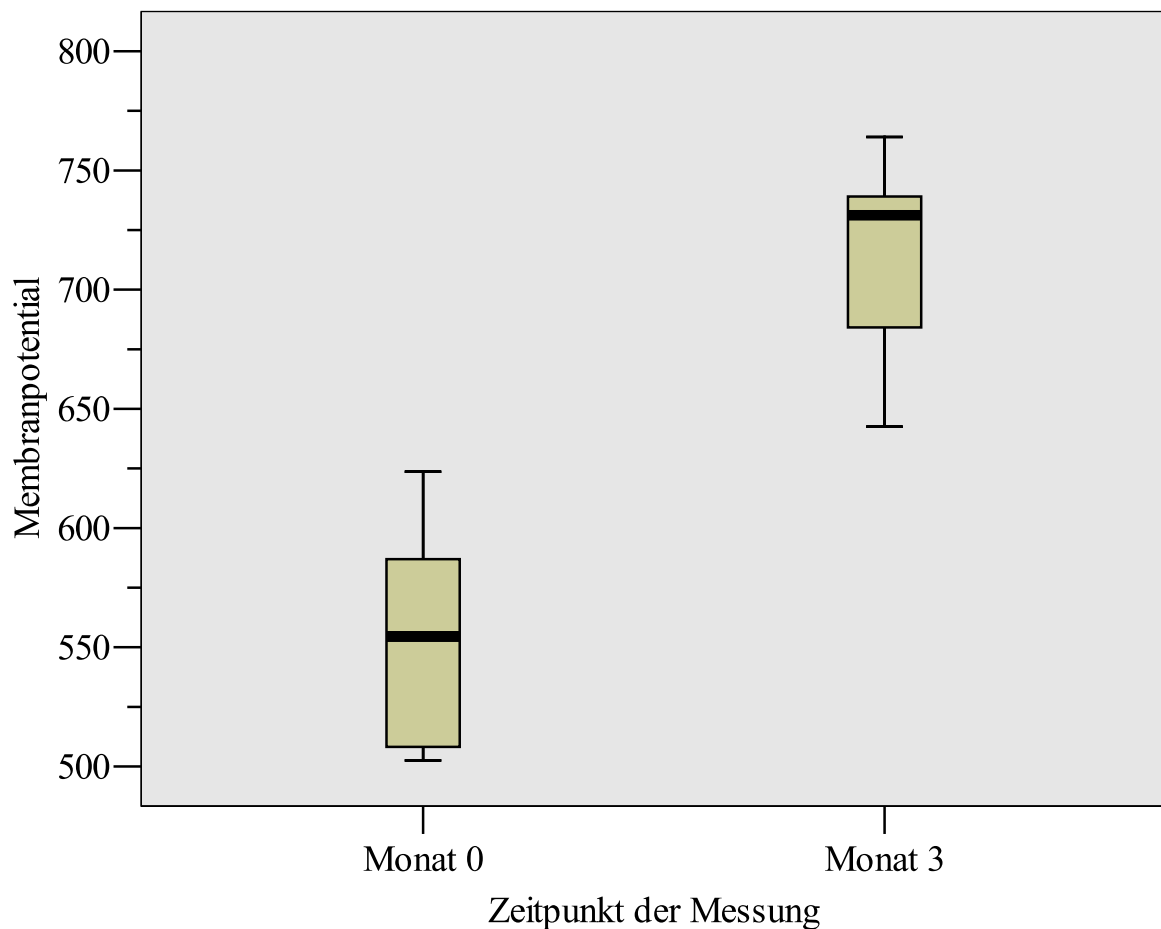


Abbildung 18: Mitochondriales Membranpotential der 6 HIV-infizierten Patienten vor und nach dreimonatiger antiretroviraler Therapie (Boxplot-Darstellung)

11. Triacetyluridin und mitochondriales Membranpotential

Zum Zeitpunkt Monat 0 wurde bei 21 HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten das MMP ihrer PBMCs gemessen. Diese Patienten nahmen anschließend 6 Monate lang eine tägliche Dosis von 4 Kapseln à 250 mg Triacetyluridin in Kombination mit ihrer individuellen antiretroviralen Therapie ein. Die antiretrovirale Therapie wurde während dieser Zeit nicht verändert. 13 Patienten gaben vor der Einnahme von Triacetyluridin Beschwerden einer peripheren Polyneuropathie und einer Lipodystrophie an, jeweils 4 weitere Patienten litten entweder an einer peripheren Polyneuropathie oder an einer Lipodystrophie. Diese 21 Patienten wurden nach sechsmonatiger Einnahme von Triacetyluridin erneut untersucht. Während die Anzahl der Patienten mit den Symptomen einer peripheren Polyneuropathie mit 17 gleich blieb, stieg die der Patienten mit den

Zeichen einer Lipodystrophie von 17 auf 20 an. Die Messung des MMPs der PBMCs aller 21 Patienten zeigte eine leichte, jedoch nicht signifikante Zunahme von 702 ± 78 auf 729 ± 115 ($p = 0,339$).

Bei 10 Patienten kam es zu einem Anstieg des MMPs von 4 % bis 39 % über den Wert der Monat 0-Messung. Bei 11 Patienten zeigte sich eine Abnahme des MMPs von 3 % bis 19 % unter den Ausgangswert. Es konnte keine signifikante Korrelation zwischen der Veränderung des MMPs der PBMCs und einer Veränderung der CD4-Zellzahl ($r = 0,093$; $p = 0,687$) bzw. der Viruslast ($r = -0,106$; $p = 0,646$) festgestellt werden.

Die Uridinkonzentration im Plasma stieg von $5,5 \pm 3,2$ $\mu\text{mol/l}$ auf $7,4 \pm 2,2$ $\mu\text{mol/l}$ in signifikanter Weise an ($p = 0,016$). Die Untersuchungsergebnisse der Therapie mit Triacetyluridin sind in Tabelle 6 dargestellt.

	Patienten zu Beginn der Einnahme von Triacetyluridin (n = 21)	Patienten nach sechsmonatiger Einnahme von Triacetyluridin (n = 21)
Alter (Jahre) (min-max)	48,3 \pm 8,3 (34-63)	
männlich/weiblich	16/5	
BMI (kg/m ²)	24,2 \pm 3,5	23,7 \pm 3,8
HIV-Infektion (Monate) (min-max)	173,8 \pm 47,8 (85-244)	
Laborwerte:		
CD4-Zellzahl (Zellen/ μl)	452 \pm 238	477 \pm 215
(min-max)	(125-1071)	(118-792)
CD4-Zellzahl (%) (min-max)	24,1 \pm 11,3 (4-49)	22,7 \pm 9,7 (4-48)
CD4-Nadir (Zellen/ μl) (min-max)	243 \pm 189 (6-616) [#]	
HIV-RNA (10 ³ Kopien/ml)	7,1 \pm 20,3	7,9 \pm 18,0
HIV-RNA, ≤ 50 Kopien /ml	13/21	15/21
Laktat (mmol/l)	1,40 \pm 0,68	1,50 \pm 0,67
Cholesterin (mg/dl)	205,29 \pm 47,62	200,67 \pm 45,41
HDL-Cholesterin (mg/dl)	43,10 \pm 11,60	40,48 \pm 11,78
LDL-Cholesterin (mg/dl)	111,90 \pm 43,03	110,40 \pm 41,44
TG (mg/dl)	297,00 \pm 325,24	258,43 \pm 191,23
ALT/GPT (U/l)	37,62 \pm 20,49	52,52 \pm 83,06
AST/GOT (U/l)	17,89 \pm 3,90	37,62 \pm 26,01
Nebenwirkungen:		
periphere Polyneuropathie	17/21	17/21
Lipodystrophie	17/21	20/21

III. Ergebnisse

	Patienten zu Beginn der Einnahme von Triacetyluridin (n = 21)	Patienten nach sechsmonatiger Einnahme von Triacetyluridin (n = 21)
Therapie:		
Gesamttherapiedauer (Monate)	101,5 ± 42,1	107,9 ± 42,0
Dauer der aktuellen Therapie (Monate)	36,3 ± 43,7	42,8 ± 43,5
Therapie mit Didanosin und/oder Stavudin		2/21
Plasmauridinkonzentration (µmol/l)	5,5 ± 3,2 * §	7,4 ± 2,2 §
mitochondriales Membranpotential	702 ± 78	729 ± 115
* p < 0,05 vs. Patienten mit Einnahme von Triacetyluridin		
# bei 16 Patienten feststellbar		
§ bei 19 Patienten feststellbar		

Tabelle 6: Untersuchungsergebnisse bei den 21 HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten vor und nach sechsmonatiger Einnahme von Triacetyluridin

12. Reproduzierbarkeit des JC-1-Assays zur Messung des mitochondrialen Membranpotentials

Bei 2 gesunden Probanden, 3 HIV-infizierten, antiretroviral therapie-naiven und 6 antiretroviral langzeittherapierten Patienten wurde zum Zeitpunkt Monat 0 und zum Zeitpunkt Monat 3 das MMP der PBMCs bestimmt.

Während dieser Zeit wurde bei den therapie-naiven Patienten keine Therapie begonnen und bei den antiretroviral langzeittherapierten Studienteilnehmern die Zusammensetzung der antiretroviralen Therapie nicht verändert. In diesen 3 Monaten änderten sich weder die CD4-Zellzahl und die Viruslast noch das klinische Bild in signifikanter Weise, so dass bei diesen Studienteilnehmern von einem gleich gebliebenen Status ausgegangen werden kann. Bei der Monat 0-Messung betrug der Wert des MMPs der PBMCs 714 ± 108 , nach 3 Monaten 685 ± 84 . Die Berechnung des Variationskoeffizienten bei intraindividuellen

Messungen ergab einen Wert von 5,34 %. Die intraindividuellen Messungen zeigten eine hoch signifikante lineare Korrelation ($r = 0,763$, $p = 0,006$) (Abbildung 19). Der T-Test bei gepaarten Stichproben zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Messreihen ($p = 0,2$) (Tabelle 7). Das MMP hatte sich also bei den 11 Studienteilnehmern nicht signifikant verändert. Daraus kann auf eine gute Reproduzierbarkeit des JC-1-Assays zur Messung des MMPs von PBMCs geschlossen werden.

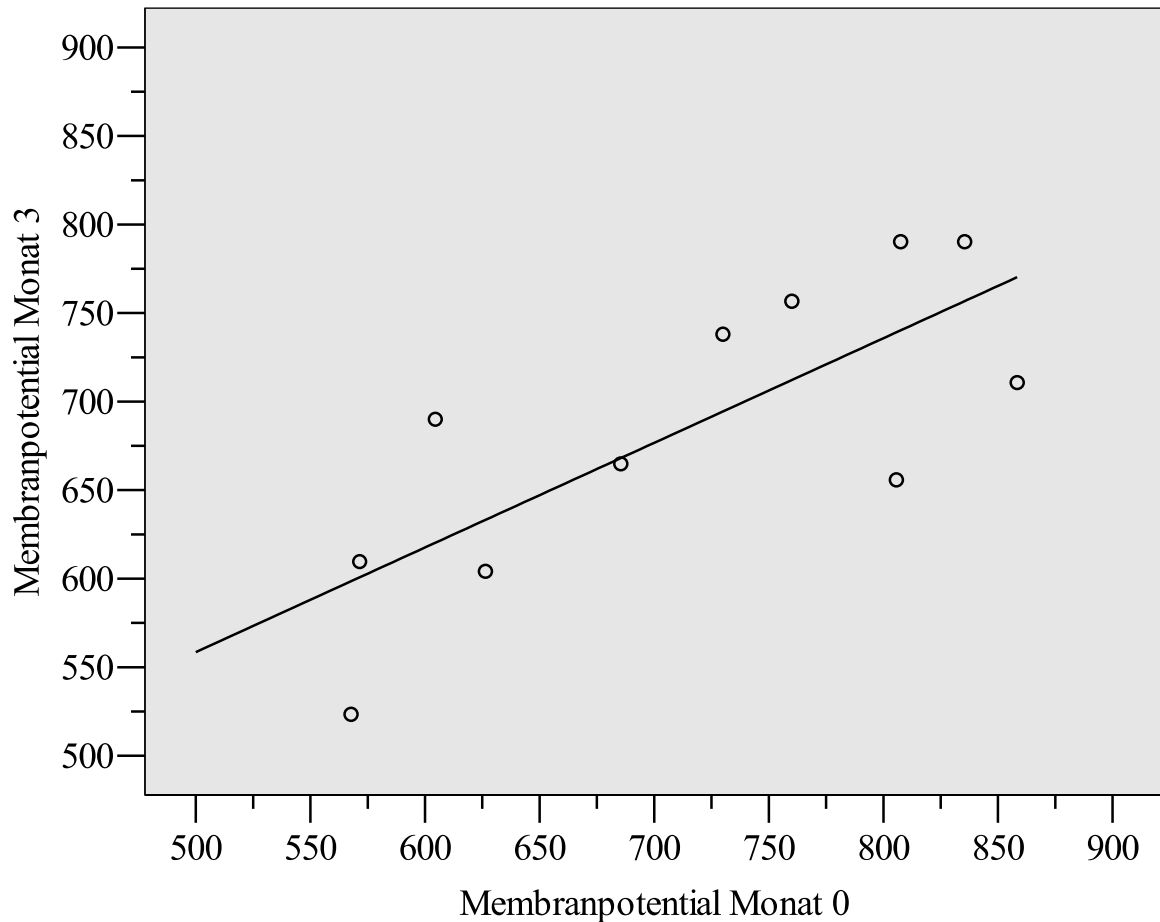


Abbildung 19: Korrelation des mitochondrialen Membranpotentials der 11 Studienteilnehmer zum Zeitpunkt Monat 0 und Monat 3

Studien- teilnehmer		Membran- potential Monat 0	Membran- potential Monat 3
1	gesunder Proband	835	790
2	gesunder Proband	808	790
3	antiretroviral therapienaiver Patient	858	711
4	antiretroviral therapienaiver Patient	685	665
5	antiretroviral therapienaiver Patient	571	610
6	antiretroviral therapierter Patient	760	757
7	antiretroviral therapierter Patient	730	738
8	antiretroviral therapierter Patient	626	604
9	antiretroviral therapierter Patient	806	656
10	antiretroviral therapierter Patient	568	523
11	antiretroviral therapierter Patient	604	690
Mittelwert \pm Standardabweichung		714 \pm 108	685 \pm 84

Tabelle 7: Mitochondriales Membranpotential der 11 Studienteilnehmer zum Zeitpunkt Monat 0 und Monat 3

IV. Diskussion

1. HIV-Infektion und mitochondriales Membranpotential

Bei den Untersuchungen über die Auswirkungen einer HIV-Infektion auf den Patienten wurde schon relativ früh eine Störung der Funktion von Mitochondrien als ursächlich vermutet. Cherry et al. berichten, dass um das Jahr 1990 bei drei HIV-infizierten, therapienaiven Patienten aufgrund mitochondrialer Funktionsstörungen eine stark ausgeprägte Laktatazidose auftrat (Cherry et al. 2005). Eine HIV-assoziierte Demenz bedingt durch eine erhöhte Apoptoserate bei Astrozyten wurde ebenfalls auf mitochondriale Defekte zurückgeführt (Cherry und Wesselingh 2003).

Die Einschränkung der mitochondrialen Funktion ist unter anderem durch eine geringer polarisierte Mitochondrienmembran charakterisiert, d.h. das mitochondriale Membranpotential (MMP) ist erniedrigt (Polo et al. 2003).

In dieser Arbeit wurde zunächst das MMP von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) bei gesunden Probanden und bei HIV-infizierten, antiretroviral therapienaiven Patienten gemessen. Im Vergleich zu dem MMP der 8 gesunden Probanden war das MMP der 13 HIV-infizierten, antiretroviral therapienaiven Patienten signifikant erniedrigt. Damit steht als erstes wichtiges Ergebnis dieser Arbeit fest: Die Messungen mit der JC-1-Assay und die beschriebene Auswertung ergeben bei HIV-infizierten Patienten ein signifikant niedrigeres MMP ihrer PBMCs im Vergleich zu dem MMP der gesunden Probanden.

Diese Beobachtungen werden in sehr guter Weise durch frühere Studien bestätigt. So stellten Macho et al. und Petit et al. fest, dass das MMP von T-Lymphozyten bei HIV-infizierten, antiretroviral therapienaiven Patienten im Vergleich zu dem MMP von T-Lymphozyten bei gesunden Probanden verringert war (Macho et al. 1995; Petit et al. 2005). Polo et al. verglichen die mit dem JC-1-Assay untersuchte Mitochondrienfunktion der PBMCs gesunder Probanden mit der von HIV-infizierten, therapienaiven Patienten und der von HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten. Bei den HIV-infizierten, antiretroviral therapienaiven Patienten war der Prozentsatz geschädigter Mitochondrien im Vergleich zu dem der gesunden Probanden erhöht, jedoch nicht signifikant (Polo et al. 2003).

Die HIV-infizierten, therapienaiven Patienten unterschieden sich von den gesunden Probanden neben dem MMP noch in weiteren Parametern, bei denen ein direkter Einfluss des HI-Virus angenommen werden kann.

Die CD4-Zellzahl der 13 HIV-infizierten, antiretroviral therapienaiven Patienten war gegenüber der CD4-Zellzahl der 8 gesunden Probanden signifikant erniedrigt. Für die gesunden Probanden wurde der in der Literatur beschriebene Normalwert der CD4-Zellzahl angenommen (Neumeister und Brückel 2003). Zwischen dem MMP und der CD4-Zellzahl dieser 13 Patienten war jedoch keine Korrelation feststellbar. Diese Beobachtung könnte durch die relativ geringe n-Zahl der Patienten dieser Gruppe erklärt werden. Der CD4-Nadir, die geringste beim betreffenden Patienten jemals gemessene CD4-Zellzahl, lässt ebenfalls auf den Zustand des Immunsystems und der Mitochondrien und auf den Langzeitverlauf einer HIV-Infektion schließen (Miller et al. 1999). Die Auswertung der HIV-infizierten, antiretroviral therapienaiven Patienten ergab eine hoch signifikante Korrelation zwischen dem CD4-Nadir und dem MMP. Patienten mit einem niedrigen MMP besitzen einen niedrigen CD4-Nadir.

Diese Versuchsergebnisse zeigen eindeutig einen Zusammenhang einer HIV-Infektion mit der Abnahme des MMPs und einer gestörten Funktion der Mitochondrien von PBMCs.

Da auch der Einfluss allgemein mitochondrial schädigend wirkender Stoffe, wie z.B. Alkohol, als weitgehend ausgeschlossen betrachtet werden kann, ist anzunehmen, dass die Infektion mit dem HI-Virus für die Verminderung der Mitochondrienfunktion maßgeblich verantwortlich ist.

Eine weitere Möglichkeit, den Einfluss der HIV-Infektion auf Mitochondrien zu untersuchen, ist die experimentelle Bestimmung des Gehalts an mitochondrialer DNA (mtDNA). Bei HIV-infizierten, antiretroviral therapienaiven Patienten war im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen der mtDNA-Gehalt der PBMCs vermindert (Cote et al. 2002; Chiappini et al. 2004; Miro et al. 2004; Maagaard et al. 2006).

Die durch das HI-Virus hervorgerufene mitochondriale Funktionsstörung ist sicherlich multifaktoriell bedingt.

Die HIV-Infektion führt beim Patienten durch die fortschreitende und irreversible Verringerung der CD4-Zellzahl zu einer Immunschwäche. Es kommt zu einer dauerhaften Aktivierung des Immunsystems mit vermehrtem Umsatz von T-Lymphozyten aufgrund einer erhöhten Produktion und Zerstörung dieser Zellen. Durch den erhöhten Umsatz, der auf einer verkürzten Lebensdauer und einer erhöhten Proliferation der T-Lymphozyten

beruht, kann die Replikation der mitochondrialen DNA eingeschränkt sein (Gougeon 2003; de Mendoza et al. 2004). Da die mtDNA wichtige Gene der Atmungskette kodiert, kann es bei der Unterschreitung eines bestimmten Schwellenwerts zu einer negativen Beeinflussung der Atmungskette und damit zu mitochondrialen Funktionsstörungen kommen (Walker und Venhoff 2005; Hoschele 2006).

Nach Gougeon ist eine hohe Apoptoserate für die Schädigung der Mitochondrien und die Destruktion der T-Zellen bei der HIV-Infektion verantwortlich (Gougeon 2003). Mehrere Studien weisen auf die wichtige Rolle der mitochondrial vermittelten erhöhten Apoptoserate von CD4-Zellen bei HIV-infizierten, antiretroviral therapienaiven Patienten hin (Miura et al. 2003). Ein verringertes MMP kann bereits selbst die Einleitung der Apoptose bewirken. Ebenso kann der Zusammenbruch des MMPs eine Teilreaktion in der durch virale Effekte hervorgerufenen Apoptose darstellen (Badley et al. 2003). HIV-kodierte virale Proteine, die direkt oder indirekt das MMP verringern, können die Apoptose einleiten (Miro et al. 2004). Eine erhöhte Apoptoserate der PBMCs aufgrund der HIV-Infektion kann somit das erniedrigte MMP dieser Zellen bei HIV-infizierten, antiretroviral therapienaiven Patienten im Vergleich zu dem MMP bei gesunden Probanden erklären.

Bei den HIV-infizierten, antiretroviral therapienaiven Patienten korrelierte die Höhe der Viruslast in signifikanter Weise umgekehrt proportional mit dem MMP. Damit konnte wahrscheinlich gemacht werden, dass eine erhöhte Viruslast für die Verringerung des MMPs der PBMCs mit verantwortlich ist. Dies weist auf einen direkten Einfluss des HI-Virus auf die Mitochondrien der PBMCs hin. Nach Polo et al. könnte eine erhöhte Viruslast durch die vermehrte Produktion von Zytokinen oder die vermehrte Bindung viraler Proteine an zelluläre Rezeptoren eine Rolle bei der Verminderung des MMPs spielen (Polo et al. 2003). Die in dieser Arbeit festgestellte Korrelation von Viruslast mit dem MMP bei HIV-infizierten, antiretroviral therapienaiven Patienten geht konform mit Studien, die eine Verringerung des mtDNA-Gehaltes in PBMCs von HIV-infizierten Patienten bei erhöhter Viruslast feststellen konnten (Miura et al. 2003; Haugaard et al. 2005).

Eine HIV-Infektion beeinflusst neben dem MMP von PBMCs auch das MMP anderer Körperzellen mit der entsprechenden Auswirkung auf das klinische Erscheinungsbild des Patienten. Das HI-Virus befällt zwar bevorzugt CD4-Lymphozyten, es sind aber auch andere Zelltypen betroffen. Von den 13 untersuchten HIV-infizierten, antiretroviral therapienaiven Patienten wies nur das einzige weibliche Mitglied dieser Gruppe Beschwerden einer peripheren Polyneuropathie auf. Bei dieser Frau wurde das geringste

MMP der PBMCs aller HIV-infizierten, antiretroviral therapienaiven Patienten gemessen. Diese Beobachtung könnte ein Hinweis sein, dass sich mit der Abnahme des MMPs von PBMCs das Krankheitsbild der HIV-infizierten Patienten zunehmend verschlechtert. Klinische Symptome treten wahrscheinlich auch erst ab einem bestimmten Schwellenwert einer mitochondrialen Funktionsstörung auf. Ein niedriges MMP von PBMCs wirkt sich vermutlich auch individuell verschieden aus, d.h. nicht jeder HIV-infizierte Patient reagiert mit der gleichen Symptomatik auf die HIV-Infektion (Cherry und Wesselingh 2003).

2. HIV-infizierte, antiretroviral therapierte Patienten und mitochondriales Membranpotential

Ziel der antiretroviralen Therapie ist die Abnahme der HI-Viruslast und die Zunahme der Zahl an CD4-Lymphozyten (Arnoult et al. 2003). Die Effizienz einer antiretroviralen Therapie konnte auch in dieser Arbeit bestätigt werden: Bei den untersuchten HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten waren im Vergleich zu den HIV-infizierten, antiretroviral therapienaiven Patienten die CD4-Zellzahl signifikant erhöht und die Viruslast signifikant erniedrigt.

Um die Auswirkungen einer antiretroviralen Therapie auf die Funktion von Mitochondrien zu untersuchen, wurde das MMP der PBMCs von HIV-infizierten Patienten gemessen, die mit verschiedenen antiretroviral wirkenden Medikamenten behandelt wurden. Die Messung des MMPs der PBMCs dieser antiretroviral therapierten Patienten ergab im Vergleich zu dem MMP von gesunden Probanden einen signifikant erniedrigten Wert. Gegenüber dem MMP der HIV-infizierten, antiretroviral therapienaiven Patienten war das MMP der HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten zwar leicht, jedoch nicht signifikant erhöht. Polo et al. konnten bei der Untersuchung der Mitochondrienfunktion von PBMCs mit dem JC-1-Assay bei HIV-infizierten, antiretroviral therapienaiven Patienten im Vergleich zu HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten auch keine signifikanten Unterschiede feststellen (Polo et al. 2003).

Die Annahme, dass eine antiretrovirale Therapie, vor allem mit Nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI), bei HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten im Vergleich zu HIV-infizierten, antiretroviral therapienaiven Patienten eine weitere Verminderung des MMPs bewirken könnte, wurde damit nicht bestätigt. Das MMP der PBMCs der HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten lag gegenüber dem MMP

der antiretroviral therapienaiven Patienten sogar etwas höher und lässt eine Verbesserung der Mitochondrienfunktion durch eine antiretrovirale Therapie vermuten. Das würde bedeuten, dass bei den HIV-infizierten Patienten die gewünschte antiretrovirale Wirkung der eingesetzten Medikamente deren mitochondriale Toxizität als Nebenwirkung vielleicht ausgleicht. Dafür spricht auch das Ergebnis der Kurzzeittherapie.

Ein Anstieg des MMPs der PBMCs weist auf eine geringere Apoptoserate der CD4-Lymphozyten hin und bedeutet eine Verbesserung der Immunfunktion. Bei allen in dieser Arbeit untersuchten HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten korreliert die CD4-Zellzahl mit dem MMP der PBMCs. Nach Polo et al. ist eine niedrige CD4-Zellzahl ein wichtiger Hinweis auf eine verminderte Mitochondrienfunktion. Dies kann auf eine Verschlechterung des Immunstatus bei fortschreitender HIV-Erkrankung zurückgeführt werden (Polo et al. 2003). Der Anstieg des MMPs lässt auf eine verbesserte Mitochondrienfunktion verbunden mit einer antiapoptotischen Wirkung der antiretroviralen Therapie schließen und erklärt damit zum Teil auch den Anstieg der CD4-Zellzahl.

Eine antiretrovirale Therapie reduziert die Viruslast und führt daher auch zu einer verminderten Produktion proapoptotischer viraler Proteine. Der antiapoptische Effekt einer antiretroviralen Therapie wurde vielfach beschrieben (Chavan et al. 1999; Phenix et al. 2002; Wasmuth et al. 2003). Die Viruslast der HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten war dementsprechend auch in dieser Arbeit gegenüber der Viruslast der therapienaiven Patienten signifikant erniedrigt.

Bei den HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten mit einer Viruslast ≤ 50 Kopien/ml war im Vergleich zu den gesunden Probanden das MMP der PBMCs signifikant erniedrigt und auch die CD4-Zellzahl signifikant geringer. Bei diesen Patienten werden die HI-Viren nur in geringer Zahl produziert. Dementsprechend müsste die Apoptoserate der CD4-Zellen sehr gering sein. Trotzdem entspricht die Funktion der Mitochondrien nicht der von gesunden Probanden. Diese Beobachtung könnte durch eine Vorschädigung durch die HIV-Infektion selbst bedingt sein oder auch auf einem schädigenden Einfluss der antiretroviralen Therapie beruhen. Möglicherweise gibt es auch einen „point of no return“. Mit Sicherheit spielen auch noch weitere Faktoren bei der Schädigung der Mitochondrien von PBMCs eine Rolle.

Bei HIV-infizierten Patienten, die im Rahmen einer antiretroviralen Therapie mit Didanosin oder mit Stavudin behandelt wurden, konnte keine Auswirkung auf das MMP ihrer PBMCs festgestellt werden. Bei HIV-infizierten Patienten, die gleichzeitig mit diesen beiden NRTIs

therapiert wurden, war das MMP der PBMCs im Vergleich zu Patienten mit einem Therapieregime ohne diese beiden NRTIs zwar vermindert, jedoch nicht in signifikanter Weise. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass mit lediglich 6 Patienten die n-Zahl relativ gering war. Dieses Ergebnis könnte trotzdem ein Hinweis darauf sein, dass eine antiretrovirale Therapie mit Didanosin oder Stavudin auf Mitochondrien auch nicht schädigender wirkt als andere NRTIs (Polo et al. 2003).

Bei HIV-infizierten, mit Stavudin therapierten Patienten konnte eine Verminderung der mtDNA in den Mitochondrien der PBMCs nachgewiesen werden. Ein geringer mtDNA-Gehalt muss sich jedoch nicht unbedingt auf die Funktion der Mitochondrien auswirken (Cote et al. 2002; de Mendoza et al. 2004; Lopez et al. 2004).

Nach Lewis et al. hemmen Didanosin und Stavudin *in vitro* die Polymerase γ und können dadurch eine Funktionsminderung der mitochondrialen Atmungskette verursachen (Lewis et al. 2003). *In-vitro*-Untersuchungen sind jedoch nur bedingt aussagekräftig, da verschiedene Kriterien wie z.B. die HIV-Infektion, der Immunstatus und der genetische Hintergrund des Patienten nicht ausreichend berücksichtigt werden können. Zur Klärung solcher Sachverhalte müssen ausreichend große Patientenkollektive genügend lange und gut definiert prospektiv untersucht werden. Zum Beispiel muss berücksichtigt werden, dass bei Mehrfachtherapien unterschiedlichster Zusammensetzung die Auswirkung des einzelnen Medikaments auf die Mitochondrien nur schwer nachweisbar ist.

Der Einfluss von Nicht-Nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTI) auf die PBMCs von HIV-infizierten Patienten wurde bisher noch relativ wenig untersucht. NNRTIs leiten vermutlich den Zelltod ein (Petit et al. 2005). In dieser Arbeit wurde deshalb das MMP der PBMCs von HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten gemessen, deren Mehrfachtherapie auch NNRTIs enthielt, und dieses mit dem MMP der PBMCs von HIV-infizierten Patienten mit einer antiretroviralen Mehrfachtherapie ohne NNRTIs verglichen. Die MMPs der PBMCs dieser beiden Patientengruppen unterschieden sich jedoch nicht signifikant voneinander. Das könnte bedeuten, dass NNRTIs ähnliche Auswirkungen auf das MMP von PBMCs haben wie andere antiretrovirale Inhibitoren oder dass der Einfluss der NRTIs bestimmend wirkt.

Antiretrovirale Medikamente hemmen die HI-Virus-Replikation auf direktem Weg, können aber auch antiapoptotisch wirken. Dieser Effekt wurde besonders bei *In-vitro*-Versuchen mit Proteaseinhibitoren (PI) beobachtet (Phenix et al. 2002). Die antiapoptotische Wirkung von PIs beruht auf verschiedenen Mechanismen: Sie verringern die Expression von

Regulatormolekülen der Apoptose, hemmen die Kaspasen, stabilisieren das MMP und vermindern dadurch die Apoptoserate der CD4-Lymphozyten (Miro et al. 2005; Petit et al. 2005). Badley et al. berichten, dass einige der therapierten HIV-infizierten Patienten kaum auf den antiretroviralen Effekt von PIs ansprachen und dennoch einen Anstieg der CD4-Zellzahl und eine Verminderung der Apoptose dieser Zellen aufwiesen (Badley et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb auch das MMP der PBMCs von HIV-infizierten Patienten gemessen, die in ihrer antiretroviralen Mehrfachtherapie ein oder mehrere PIs verabreicht bekamen. Die PI-therapierten Patienten wiesen gegenüber der Vergleichsgruppe ohne PIs in ihrer antiretroviralen Mehrfachtherapie ein leicht, aber nicht signifikant erhöhtes MMP ihrer PBMCs auf. Auch wenn das MMP der PBMCs bei dem Einsatz von PIs nur leicht erhöht wird, könnten diese Inhibitoren möglicherweise gewisse negative Auswirkungen von NRTIs auf die mitochondriale Funktion reduzieren.

Unter Umständen wirkt sich die Toxizität antiretroviraler Medikamente auf andere Zelltypen stärker aus als auf PBMCs (Chiappini et al. 2004). So ist z.B. die Aufnahme von eventuell schädigend wirkenden Medikamenten aufgrund des verminderten Stoffwechsels bei ruhenden PBMCs erniedrigt (Lopez et al. 2004). Dafür spricht die in dieser Arbeit gemachte Beobachtung, dass HIV-infizierte, antiretroviral therapierte Patienten im Vergleich zu den gesunden Probanden und zu den HIV-infizierten, therapie-naiven Patienten häufiger Schädigungen von Nerven- bzw. Fettzellen mit der damit verbundenen Symptomatik einer peripheren Polyneuropathie bzw. einer Lipodystrophie aufweisen.

3. Infektionsdauer und mitochondriales Membranpotential

Die Untersuchung der HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten ergab keine Korrelation zwischen der Infektionsdauer und dem MMP der PBMCs. Bei den 13 HIV-infizierten, antiretroviral therapie-naiven Patienten wurde zwischen der Dauer der Infektion und dem MMP eine signifikante Korrelation festgestellt. Das bedeutet, dass bei diesen Patienten eine kurze Infektionsdauer mit einem niedrigen MMP einhergeht. Da der tatsächliche Zeitpunkt der HIV-Infektion meist nicht feststellbar ist, wurde die Infektionsdauer ab dem Zeitpunkt des ersten positiven HIV-Tests gerechnet. Deshalb kann aus diesen Ergebnissen keine fundierte Aussage über den Zusammenhang zwischen der tatsächlichen Infektionsdauer und dem MMP gemacht werden. Polo et al. konnten bei HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen

der Infektionsdauer und dem MMP der PBMCs feststellen (Polo et al. 2003). Auch Untersuchungen von Maagaard et al. ergaben keinen Zusammenhang zwischen dem mtDNA-Gehalt von PBMCs und der Dauer der HIV-Infektion (Maagaard et al. 2006).

4. Lipodystrophie, periphere Polyneuropathie und mitochondriales Membranpotential

Der Zusammenhang des MMPs von PBMCs mit den Nebenwirkungen einer antiretroviralen Therapie wie Lipodystrophie oder peripherer Polyneuropathie wurde bisher nur wenig untersucht.

Wie bereits von Carr et al. und Watters et al. bei HIV-infizierten, antiretroviral langzeittherapierten Patienten beschrieben, traten diese Nebenwirkungen auch bei den in dieser Arbeit untersuchten HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten relativ häufig auf (Carr et al. 1998; Watters et al. 2004). Die Lipodystrophie und die periphere Polyneuropathie wurden im Rahmen einer Untersuchung von den Patienten erfragt und durch erfahrene Ärzte klinisch diagnostiziert und dokumentiert. Zur Diagnose der Lipodystrophie wurde auf einen CT- bzw. DEXA-Scan verzichtet, die für die Berechnung des so genannten Lipodystrophie-Scores benötigt werden (Carr 2003).

Das MMP der PBMCs von HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten, bei denen eine Lipodystrophie auftrat, unterschied sich nicht von dem MMP der Patienten dieser Gruppe ohne eine derartige Symptomatik. Werden die Patienten mit Lipodystrophie in eine Gruppe mit Lipoatrophie und eine mit Lipohypertrophie unterteilt, unterscheidet sich das jeweilige MMP ebenfalls nicht von dem MMP der PBMCs von Patienten, die nicht an diesen Fettverteilungsstörungen litten. Auch die HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten mit einer peripheren Polyneuropathie wiesen im Vergleich zu den übrigen Patienten dieser Gruppe, die nicht die Symptome dieser Krankheit zeigten, keinen signifikanten Unterschied in den MMPs ihrer PBMCs und damit in der Funktion der Mitochondrien auf.

Die Bestimmung des MMPs von PBMCs ergab also keinen Zusammenhang zwischen einer mitochondrialen Schädigung dieser Zellen und dem Auftreten einer Lipodystrophie bzw. einer peripheren Polyneuropathie. Bei Kindern, die eine Lipodystrophie aufwiesen, ergab die Bestimmung des MMPs ihrer PBMCs mit dem JC-1-Assay ebenfalls keinen Unterschied zu dem MMP von Kindern ohne Lipodystrophie (Cossarizza et al. 2002).

Diese Ergebnisse sind verständlich, da in dieser Arbeit PBMCs das Untersuchungsobjekt darstellen und nicht die bei diesen Erkrankungen direkt betroffenen Fett- und Nervenzellen. Dafür spricht, dass bei Patienten mit einer Lipodystrophie oder einer peripheren Polyneuropathie im Vergleich zu gesunden Probanden der mtDNA-Gehalt in Adipozyten, jedoch nicht in PBMCs verringert war (Rabing Christensen et al. 2004). In anderen Studien war eine Verringerung des mtDNA-Gehalts in Adipozyten nicht nachweisbar. Möglicherweise beruhen diese widersprüchlichen Ergebnisse auf der unterschiedlichen Diagnose einer Lipodystrophie aufgrund subjektiver Äußerungen von Ärzten und/oder Patienten (Casula et al. 2007).

Die bei den HIV-infizierten, antiretroviral langzeittherapierten Patienten aufgetretenen Nebenwirkungen konnten nicht einer bestimmten Mehrfachtherapie zugeordnet werden. Die Vermutung, dass die beiden auf Mitochondrien besonders toxisch wirkenden NRTIs Didanosin und Stavudin für ein verstärktes Auftreten dieser Nebenwirkungen verantwortlich sind, konnte nicht bestätigt werden. Die Untersuchungen in dieser Arbeit ergaben vielmehr, dass bei einer antiretroviralen Therapie mit diesen beiden NRTIs eine periphere Polyneuropathie sogar signifikant seltener auftrat. Es wäre denkbar, dass mit dem Auftreten dieser Nebenwirkung die antiretrovirale Therapie auf weniger toxische NRTIs umgestellt wurde. Wird bei HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten mit einer Lipodystrophie die Therapie mit den NRTIs Didanosin und Stavudin beendet, so verringert sich die Depletion der mtDNA, noch bevor sich die Symptome der Lipodystrophie bessern (Cherry et al. 2006).

Die Messung des MMPs von PBMCs mit dem JC-1-Assay eignet sich aufgrund der vorliegenden Ergebnisse eher nicht zur Früherkennung einer Lipodystrophie oder einer peripheren Polyneuropathie als Nebenwirkungen einer antiretroviralen Therapie. Die Entstehung dieser Nebenwirkungen ist mit Sicherheit komplex. Möglicherweise wäre die Messung des MMPs von Fett- bzw. Nervenzellen zur Untersuchung der mitochondrialen Mechanismen besser geeignet, die bei HIV-infizierten Patienten zu einer Lipodystrophie bzw. einer peripheren Polyneuropathie als Nebenwirkungen einer antiretroviralen Therapie führen.

5. Geschlecht und mitochondriales Membranpotential

Das MMP der PBMCs der weiblichen Studienteilnehmer war im Vergleich zu dem der männlichen Studienteilnehmer bei den gesunden Probanden, bei den HIV-infizierten, antiretroviral therapienaiven Patienten und auch bei den HIV-infizierten, antiretroviral therapieren Patienten geringfügig niedriger. In der Gruppe der antiretroviral therapierten Patienten waren die Frauen signifikant jünger als die Männer. Dies erklärt jedoch nicht das leicht erniedrigte MMP der PBMCs, da in dieser Arbeit allgemein kein Zusammenhang zwischen dem MMP und dem Alter der Studienteilnehmer festgestellt werden konnte. Die Veränderungen des MMPs von PBMCs scheinen also bei vergleichenden Untersuchungen von gesunden Probanden, HIV-infizierten, therapienaiven und HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten vom Geschlecht unabhängig zu sein, soweit die geringe Anzahl an weiblichen Studienteilnehmern eine solche Aussage zulässt. Dies gilt auch für die weiteren Ergebnisse der Laboruntersuchungen, bei denen ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den männlichen und weiblichen Studienteilnehmern festgestellt werden konnte.

Die multivariate Analyse zeigte bei den weiblichen Studienteilnehmern im Vergleich zu den männlichen Studienteilnehmern ein signifikant erniedrigtes MMP der PBMCs. Dieses Ergebnis beruht jedoch auf einer Vielzahl an untersuchten Faktoren, so dass eine exakte Erklärung nicht möglich ist.

Verschiedene Studien ergaben, dass bei weiblichen HIV-infizierten Patienten häufiger Nebenwirkungen oder Komplikationen bei einer antiretroviralen Therapie im Vergleich zu männlichen HIV-infizierten und antiretroviral therapierten Patienten auftreten (Nolan und Mallal 2004). Das Risiko, bei einer antiretroviralen Therapie mit NRTIs an Laktatazidose, Pankreatitis oder Lipodystrophie zu erkranken, ist bei den weiblichen HIV-infizierten Patienten erhöht (Anderson et al. 2004). Auch in dieser Arbeit war in der Gruppe der HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten die Rate der an Lipodystrophie erkrankten weiblichen Studienteilnehmer im Vergleich zu der bei den männlichen Patienten höher. Eine periphere Polyneuropathie als Nebenwirkung einer antiretroviralen Therapie trat jedoch bei den untersuchten männlichen und weiblichen Patienten gleich häufig auf.

6. Kurzzeittherapie und mitochondriales Membranpotential

Aus der Gruppe der 13 HIV-infizierten, antiretroviral therapienaiven Patienten wurden 6 Patienten gemäß den deutsch-österreichischen Leitlinien zur antiretroviralen Therapie der HIV-Infektion für eine antiretrovirale Therapie ausgewählt (Arastéh K 2005). Diese wiesen zum Teil erhebliche durch die HIV-Infektion bedingte Symptome wie z.B. eine periphere symmetrische Polyneuropathie auf. Im Vergleich zu den nicht für die Therapie ausgewählten Patienten dieser Gruppe war bei diesen 6 Patienten die Infektionsdauer signifikant kürzer. Aufgrund des deutlich reduzierten Immunstatus waren diese Patienten vermutlich bereits seit längerer Zeit mit dem HI-Virus infiziert, ohne dass jedoch ein HIV-Test durchgeführt worden war, oder hatten eine schnellere Krankheitsprogression (fast progressors).

Diese 6 Patienten wiesen zu Beginn der Therapie ein signifikant niedrigeres MMP ihrer PBMCs im Vergleich zu dem MMP der restlichen 7 therapienaiven Patienten dieser Gruppe auf. Die CD4-Zellzahl und der CD4-Nadir waren ebenfalls signifikant erniedrigt. Die verringerte CD4-Zellzahl deutet auf eine reduzierte Immunfunktion im Vergleich zu den übrigen HIV-infizierten, antiretroviral therapienaiven Patienten der Gruppe hin. Die Viruslast war bei diesen 6 Patienten jedoch nicht signifikant höher als bei den unbehandelten Patienten dieser Gruppe.

Die Messung des MMPs der PBMCs bei den 6 HIV-infizierten Patienten ergab nach dreimonatiger antiretroviraler Therapie eine signifikante Erhöhung und damit ein weiteres wichtiges Ergebnis dieser Arbeit.

Bei 5 der 6 HIV-infizierten Patienten hatte sich nach dreimonatiger antiretroviraler Therapie die CD4-Zellzahl erhöht, bei einem Patienten erniedrigt. Insgesamt erhöhte sich die CD4-Zellzahl, jedoch nicht in signifikanter Weise. Die Viruslast der HIV-infizierten Patienten hatte nach der dreimonatigen antiretroviralen Therapie in signifikanter Weise abgenommen.

Die Verbesserung des immunologischen Zustands der kurzzeitig antiretroviral therapierten Patienten beruht wahrscheinlich auf einer Verminderung der Apoptoserate der CD4-Zellen, z.B. durch eine verringerte Produktion viraler Proteine. Böhler et al. konnten bei HIV-infizierten Patienten nach einer 6 - 8 wöchigen antiretroviralen Therapie eine Verringerung der Apoptoserate von CD4-Lymphozyten nachweisen (Böhler et al. 1999).

Die multivariate Analyse bei den 6 untersuchten Patienten ergab unter Berücksichtigung der einzelnen Faktoren folgendes Ergebnis: Ein erhöhtes MMP ist verbunden mit einer signifikanten Verringerung der Viruslast und einem signifikanten Anstieg der CD4-Zellzahl. Die Erhöhung der CD4-Zellzahl und die Verringerung der Viruslast durch die antiretrovirale Therapie stehen also in einem Zusammenhang mit der Erhöhung des MMPs von PBMCs.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen deshalb den Zusammenhang zwischen der Abnahme der Viruslast bzw. der Zunahme der CD4-Zellzahl mit einer Verbesserung des Funktionszustandes von Mitochondrien durch eine dreimonatige antiretrovirale Therapie bei HIV-infizierten Patienten. Casula et al. führten den signifikanten Anstieg der mtDNA und der mtRNA in PBMCs nach 48-wöchiger antiretroviraler Therapie ebenfalls auf eine zumindest kurzfristige Verringerung der durch das HI-Virus hervorgerufenen mitochondrialen Schädigungen zurück (Casula et al. 2005).

Im Vergleich zu den HIV-infizierten, antiretroviral langzeittherapierten Patienten zeigte sich das MMP der 6 Patienten nach dreimonatiger antiretroviraler Therapie leicht erhöht. Die CD4-Zellzahl sowie der Anteil an Patienten, bei denen keine HIV-RNA mehr nachgewiesen werden konnte (Viruslast ≤ 50 Kopien/ml), waren bei diesen 6 Patienten im Vergleich zu den langzeittherapierten Patienten signifikant erniedrigt. Eigentlich wäre bei Patienten mit einer antiretroviralen Langzeittherapie im Vergleich zu Patienten mit nur dreimonatiger antiretroviraler Therapie aufgrund der höheren CD4-Zellzahl und der höheren Anzahl an Patienten ohne nachweisbare Viruslast ein erhöhtes MMP zu erwarten, da aufgrund der multivariaten Analyse die CD4-Zellzahl und die Viruslast die beiden wichtigsten Einflussfaktoren auf das MMP darstellen. Das MMP der PBMCs könnte jedoch nach längerer Therapiedauer wieder abnehmen. Diese Beobachtung deutet auf schädigende Einflüsse einer antiretroviralen Therapie hin. Antiretroviral wirkende Medikamente scheinen trotz steigender CD4-Zellzahl langfristig das MMP der PBMCs zu senken und damit die Funktionsweise von Mitochondrien negativ zu beeinflussen. Obwohl bei den HIV-infizierten, antiretroviral langzeittherapierten Patienten keine Korrelation zwischen der Therapiedauer mit dem MMP der PBMCs nachgewiesen werden konnte, lässt sich aus den Untersuchungsergebnissen vermuten, dass die Mitochondrienfunktion nach längerer antiretroviraler Therapie vermindert wird. Mit Sicherheit spielt bei diesen Überlegungen auch die Auswahl der antiretroviral wirkenden Medikamente eine Rolle. So wurden die 6

HIV-infizierten Patienten 3 Monate lang mit den auf Mitochondrien relativ gering toxisch wirkenden NRTIs wie Tenofovir, Abacavir und Lamivudin behandelt.

7. Triacetyluridin und mitochondriales Membranpotential

Einige Nebenwirkungen wie die Lipodystrophie oder die periphere Polyneuropathie, die bei HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten auftreten, werden auf eine Langzeittherapie mit NRTIs zurückgeführt (Venhoff et al. 2002). Ein Ansatzpunkt, diese Nebenwirkungen einer antiretroviralen Therapie zu verringern, könnte der Einsatz von Uridin sein (Walker 2006). In-vitro-Untersuchungen an Hepatozyten zeigen, dass Uridin die durch eine antiretrovirale Therapie mit NRTIs bedingte Schädigung der Mitochondrien vermindert. Uridin verlangsamt die mtDNA-Depletion, verbessert die Funktion der mitochondrial kodierten Untereinheiten der Atmungskette und verhindert den Zelltod (Walker et al. 2003). Die schädigenden Auswirkungen von Zidovudin auf die hämatopoetischen Zellen im Knochenmark konnten ebenfalls verringert werden (Sommadossi et al. 1988). Der Einsatz von Uridin führte bei Stavudin-exponierten Adipozyten zu einer Normalisierung der Fettspeicherung und der Mitochondrienfunktion. Allerdings lag bei diesen In-vitro-Untersuchungen die Uridinkonzentration exzessiv hoch zwischen 50 $\mu\text{mol/l}$ und 200 $\mu\text{mol/l}$. Bei einer Konzentration unter 50 $\mu\text{mol/l}$ ließ sich eine Auswirkung auf die untersuchten Zellen nicht nachweisen (Walker et al. 2003; Walker et al. 2006).

Soweit bekannt ist der Einfluss einer Therapie mit Uridin auf das MMP von PBMCs bisher noch nicht untersucht worden. In dieser Arbeit wurden deshalb HIV-infizierte, bereits seit längerer Zeit antiretroviral therapierte Patienten sechs Monate lang mit dem Uridin-Analogon Triacetyluridin behandelt. Triacetyluridin besitzt gegenüber Uridin die bereits in der Einleitung beschriebenen Vorteile. Während der sechsmonatigen Therapie stieg der Plasmauridinspiegel signifikant an.

Das MMP erhöhte sich in dieser Zeit nur geringfügig und nicht signifikant. Eine Therapie mit Triacetyluridin in der applizierten Dosis und Dauer scheint also das MMP von PBMCs und die Funktion der Mitochondrien von HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten nur in geringem Maße zu verbessern. In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass sich auch das MMP der PBMCs von HIV-infizierten Patienten durch eine antiretrovirale Langzeittherapie kaum ändert. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem MMP der

PBMCs von HIV-infizierten Patienten und einer antiretroviralen Langzeittherapie bzw. der therapeutischen Gabe von Triacetyluridin konnte damit nicht belegt werden.

Der Anstieg des Plasmauridinspiegels bei einer sechsmonatigen Therapie mit Triacetyluridin war zwar signifikant, erreichte aber mit $7,4 \pm 2,2 \mu\text{mol/l}$ bei weitem nicht die Konzentrationen, die bei In-vitro-Untersuchungen die Schädigung von Mitochondrien vermindern. Es wäre durchaus vorstellbar, dass durch eine stark erhöhte Tagesdosis an Triacetyluridin die Plasmauridinkonzentration auf therapeutisch wirksame Werte ansteigen könnte und damit die Nebenwirkungen einer antiretroviralen Therapie abgemildert werden könnten.

Die HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten wurden lediglich 6 Monate lang mit Triacetyluridin therapiert. Unter Umständen führt erst eine längere Behandlungsdauer zu einer Erhöhung des MMPs der PBMCs und ermöglicht dann eine erfolgreiche Therapie der Nebenwirkungen.

Die Anzahl der HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten mit den Symptomen einer peripheren Polyneuropathie blieb nach der sechsmonatigen Behandlung mit Triacetyluridin gleich. Die Anzahl der HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten mit den Zeichen einer Lipodystrophie nahm jedoch leicht zu. Möglicherweise wäre auch die Messung des MMPs von z.B. Adipozyten anstelle von PBMCs besser geeignet, um den therapeutischen Effekt von Triacetyluridin auf die Nebenwirkungen einer antiretroviralen Therapie wie z.B. einer Lipodystrophie zu untersuchen.

V. Zusammenfassung und Ausblick

Der Einsatz hochwirksamer antiretroviraler Kombinationstherapien hat die Lebensqualität von HIV-infizierten Patienten wesentlich verbessert und auch ihre Lebenserwartung erhöht. Bei längerer antiretroviraler Therapiedauer treten jedoch häufig unerwünschte Nebenwirkungen auf. Diese beruhen zumindest teilweise auf einer Schädigung der Mitochondrien durch das HI-Virus selbst bzw. durch antiretroviral wirkende Medikamente wie z.B. Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI). Eine genaue Beurteilung mitochondrialer Schädigungen bei HIV-infizierten, antiretroviral therapienaiven und antiretroviral therapierten Patienten war bisher aufgrund fehlender exakter Untersuchungsmethoden noch nicht möglich.

Ein wichtiges Forschungsziel ist deshalb die Entwicklung einer gering invasiven und klinisch relativ einfach durchzuführenden Methode, um die mitochondriale Funktionsstörung durch eine HIV-Infektion bzw. durch eine antiretrovirale Therapie möglichst frühzeitig feststellen zu können.

Aufgabe dieser Arbeit war die Untersuchung des Funktionszustandes der Mitochondrien durch die Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC). Als Untersuchungsmethode bot sich der JC-1-Assay an, mit dem das MMP dieser Zellen gemessen werden kann. Ein Vergleich der Messergebnisse sollte Aussagen über die schädigenden Wirkungen einer HIV-Infektion selbst und einer antiretroviralen Kurz- bzw. Langzeittherapie auf die Mitochondrien von PBMCs ermöglichen. Darüber hinaus sollten die Ergebnisse in Bezug zu anderen klinischen und biochemischen Parametern gesetzt und analysiert werden.

Eine weitere Aufgabe dieser Arbeit war die Messung des MMPs von PBMCs vor und nach einer sechsmonatigen Therapie mit Triacetyluridin bei HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten, die als Nebenwirkung ihrer antiretroviralen Therapie eine periphere Polyneuropathie und/oder eine Lipodystrophie aufwiesen.

Insgesamt wurde das MMP der PBMCs von 8 gesunden Probanden, 13 HIV-infizierten, antiretroviral therapienaiven und 59 HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten gemessen. Aus der Gruppe der HIV-infizierten, antiretroviral therapienaiven Patienten wurden 6 Patienten ausgewählt und das MMP ihrer PBMCs vor und nach einer dreimonatigen antiretroviralen Therapie bestimmt. 21 HIV-infizierte, antiretroviral

therapierte Patienten wurden 6 Monate lang mit Triacetyluridin behandelt. Das MMP ihrer PBMCs wurde vor und nach der Behandlung bestimmt und im Zusammenhang mit laborchemischen und immunologischen Parametern betrachtet.

Die Reproduzierbarkeit der Messungen des MMPs von PBMCs mit dem JC-1-Assay wurde durch die Untersuchungen bestätigt.

Die Messungen ergaben, dass das MMP der PBMCs der HIV-infizierten, antiretroviral therapienaiven Patienten und auch das MMP der HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten im Vergleich zu dem MMP von gesunden Probanden signifikant erniedrigt war. Die HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten wiesen im Vergleich zu den HIV-infizierten, antiretroviral therapienaiven Patienten ein leicht, jedoch nicht signifikant erhöhtes mitochondriales Membranpotential auf. Bei allen HIV-infizierten Patienten zeigte sich eine hoch signifikante Pearson-Korrelation sowohl der CD4-Zellzahl als auch der Viruslast mit dem MMP. Eine erhöhte Viruslast und eine verringerte CD4-Zellzahl lassen auf ein erniedrigtes MMP und damit auf eine verminderte Funktion der Mitochondrien von PBMCs schließen.

Eine dreimonatige antiretrovirale Therapie bei 6 ausgewählten HIV-infizierten, antiretroviral therapienaiven Patienten verursachte einen signifikanten Anstieg des MMPs. Die gemessenen Werte des MMPs lagen höher als die von HIV-infizierten, antiretroviral langzeittherapierten Patienten, ein Hinweis, dass mit zunehmender Therapiedauer das MMP und damit die Funktion der Mitochondrien der PBMCs wieder abnehmen.

Die multivariate Analyse ergab einen signifikanten Zusammenhang zwischen einem erniedrigten MMP und einer verringerten CD4-Zellzahl, einer erhöhten Viruslast und dem weiblichen Geschlecht. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem MMP und der Zusammensetzung der antiretroviralen Mehrfachtherapie sowie deren Nebenwirkungen in Form einer Lipodystrophie oder einer peripheren Polyneuropathie konnte aufgrund der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen nicht nachgewiesen werden.

Bei den HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten, die als Nebenwirkung eine Lipodystrophie und/oder eine periphere Polyneuropathie aufwiesen, stieg das MMP ihrer PBMCs nach sechsmonatiger Behandlung mit Triacetyluridin leicht, jedoch nicht signifikant an.

Die Untersuchungen in dieser Arbeit zeigen die Zusammenhänge zwischen dem MMP der PBMCs und einer HIV-Infektion bzw. einer antiretroviralen Therapie auf. Die Messung des

MMPs ermöglicht damit Aussagen über den Funktionszustand der Mitochondrien der PBMCs.

Der JC-1-Assay hat sich als gute Methode zur Messung des Membranpotentials von Mitochondrien in PBMCs erwiesen. Die Ergebnisse dieser Arbeit bieten neue Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen auf diesem Forschungsgebiet. Werden z.B. mehr HIV-infizierte Patienten insbesondere in prospektive Studien einbezogen, so lässt sich auch der Einfluss einer bestimmten Mehrfachtherapie auf die PBMCs dieser Patienten genauer untersuchen. Die Messung des MMPs von anderen Körperzellen, z.B. von Fettzellen bei Patienten mit Lipodystrophie, könnte Hinweise über die Entstehung dieser Nebenwirkung einer antiretroviralen Therapie geben. Zu klären wäre auch, ob eine Behandlung mit Triacetyluridin mit erhöhten Tagesdosen oder in einer Langzeittherapie die Nebenwirkungen einer antiretroviralen Therapie vermindert.

Bei einer HIV-Infektion muss wie bei allen Infektionskrankheiten eine spezifische Therapie gegen den Erreger selbst gerichtet sein. Mit den derzeit zur Verfügung stehenden antiretroviralen Therapien ist eine Eradikation des Virus nicht möglich. Antiretroviral wirkende Medikamente können die Krankheit nicht heilen. Sie mildern nur die belastenden Auswirkungen auf den Patienten und verlängern die Lebensdauer. Eine antiretrovirale Therapie ist für den Patienten jedoch mit schädigenden Nebenwirkungen verbunden. Deshalb sollte die Entwicklung hin zu Medikamenten mit möglichst geringen Nebenwirkungen gehen. Richtungsweisend für die Zukunft wären auch Therapieansätze im Rahmen einer Gentherapie oder die Entwicklung einer Vakzination. Die wirksamste Strategie ist jedoch die weltweite Aufklärung und Prävention mit dem Ziel, die HIV/AIDS-Pandemie in den nächsten Jahren einzudämmen.

VI. Abkürzungsverzeichnis

ACTG	AIDS Clinical Trials Group
ADP	Adenosindiphosphat
AIDS	erworbenes Immunschwäche-Syndrom (acquired immunodeficiency syndrome)
ALT	Alaninaminotransferase
aP	Alkalische Phosphatase
AST	Aspartataminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	Body Mass Index
CCR-4	Chemokinrezeptor 4
CCR-5	Chemokinrezeptor 5
CK	Creatinkinase
CRP	C-reaktives Protein
DHODH	Dihydroorotatdehydrogenase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Didesoxynukleosid-Triphosphat
DPBS	Dulbecco's PBS
env	Envelope
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FAD	Flavinadenindinucleotid
FCCP	Carbonylcyanid-4-trifluoromethoxyphenylhydrazon
FL	Fluoreszenzkanal
FSC	Vorwärtsstreulicht (forward scatter)
gag	group-antigene
γ -GT	γ -Glutamyltransferase
HAART	hoch aktive antiretrovirale Therapie (highly active antiretroviral therapy)
HDL-Cholesterin	High-Density-Lipoprotein-Cholesterin
HIV	humanes Immunschwächevirus (human immunodeficiency virus)
IFN- α	Interferon- α
JC-1	5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-Carbocyaniniodid
LDH	Laktatdehydrogenase
LDL-Cholesterin	Low-Density-Lipoprotein-Cholesterin
LTNP	long-term-non-progressor

LTR	long terminal repeat
MMP	mitochondriales Membranpotential
MnSOD	Mangan-Superoxid-Dismutase
mtDNA	mitochondriale Desoxyribonukleinsäure
mtPTP	mitochondrial permeability transition pore
NADH	Nikotinamidadenindinucleotid
nDNA	nukleäre Desoxyribonukleinsäure
nef	negative effector
NNRTI	Nicht-Nukleosidischer Reverse-Transkriptase-Inhibitor
NRTI	Nukleosidischer Reverse-Transkriptase-Inhibitor
NtRTI	Nukleotidischer Reverse-Transkriptase-Inhibitor
PBMC	periphere mononukleäre Blutzelle (peripheral blood mononuclear cell)
PI	Proteaseinhibitor
pol	Polymerase
Rev	posttranscriptional activator
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive sauerstoffhaltige Produkte (reactive oxygen species)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
SSC	Seitwärtsstreulicht (sideward scatter)
Tat	transcriptional transactivator
TG	Triglyceride
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
TSH	Thyreotropin
vif	virion infectivity factor
Vpr	virion protein
Vpu	virion protein u

VII. Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abbildung 1: Struktur des HIV-1 (verändert nach Freed 1998).....	2
Abbildung 2: Genomorganisation des HIV-1 (Frankel und Young 1998).....	3
Abbildung 3: Schematische Darstellung und elektronenmikroskopisches Bild eines Mitochondriums (verändert nach Mathews und Van Holde 1996)	11
Abbildung 4: Die oxidative Phosphorylierung mit den vier Multienzymkomplexen (I - IV) und der F1/F0-ATPase (V). Jeder Komplex besteht aus mehreren Untereinheiten, die von nukleärer oder mitochondrialer DNA kodiert werden (verändert nach Brinkman et al. 1998; Saraste 1999)	13
Abbildung 5: Vermuteter Mechanismus der Wirkung von Triacetyluridin bei der Therapie mitochondrialer Schädigungen durch NRTIs (verändert nach Walker 2005)	25
Abbildung 6: Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll.....	30
Abbildung 7: Strukturformel von JC-1	32
Abbildung 8: Emissionsspektrum von JC-1 bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 488 nm	32
Abbildung 9: Punkthistogramm gefärbter Zellen, aufgetragen nach Granularität (SSC) und Zellgröße (FSC).....	35
Abbildung 10: Punkthistogramm gefärbter Zellen, aufgetragen nach Fluoreszenz- eigenschaften in FL2 (rot) und in FL1 (grün).....	35
Abbildung 11: Mitochondriales Membranpotential in den Gruppen I bis III (Boxplot- Darstellung).....	42
Abbildung 12: Korrelation des mitochondrialen Membranpotentials mit der CD4- Zellzahl bei allen 71 HIV-infizierten Patienten	43
Abbildung 13: Korrelation des mitochondrialen Membranpotentials mit der CD4-Zell- zahl bei den 58 HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten	44
Abbildung 14: Zusammenhang des mitochondrialen Membranpotentials mit der CD4- Zellzahl bei den 58 HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten (Boxplot-Darstellung).....	45
Abbildung 15: Korrelation des mitochondrialen Membranpotentials mit dem CD4-Nadir bei den 13 HIV-infizierten, antiretroviral therapie-naiven Patienten	46

Abbildung 16: Zusammenhang des mitochondrialen Membranpotentials mit dem CD4-Nadir bei den 13 HIV-infizierten, therapienaiven Patienten (Boxplot-Darstellung)	47
Abbildung 17: Korrelation des mitochondrialen Membranpotentials mit der Viruslast bei den 13 HIV-infizierten, antiretroviral therapienaiven Patienten (halblogarithmische Darstellung).....	48
Abbildung 18: Mitochondriales Membranpotential der 6 HIV-infizierten Patienten vor und nach dreimonatiger antiretroviraler Therapie (Boxplot-Darstellung)	58
Abbildung 19: Korrelation des mitochondrialen Membranpotentials der 11 Studienteilnehmer zum Zeitpunkt Monat 0 und Monat 3	61

VIII. Tabellenverzeichnis

	Seite
Tabelle 1: Zur Therapie der HIV-Infektion zugelassene Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI) (Stand 2006).....	9
Tabelle 2: Untersuchungsergebnisse in den Gruppen I bis III	41
Tabelle 3: Eingesetzte antiretrovirale Substanzen und Anzahl der mit dem jeweiligen Medikament therapierten Patienten	50
Tabelle 4: Multivariate Analyse aller Studienteilnehmer.....	54
Tabelle 5: Untersuchungsergebnisse bei den 6 HIV-infizierten Patienten vor und nach dreimonatiger antiretroviraler Therapie im Vergleich zu den 58 HIV-infizierten, langfristig antiretroviral therapierten Patienten.....	57
Tabelle 6: Untersuchungsergebnisse bei den 21 HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten vor und nach sechsmonatiger Einnahme von Triacetyluridin	60
Tabelle 7: Mitochondriales Membranpotential der 11 Studienteilnehmer zum Zeitpunkt Monat 0 und Monat 3	62

IX. Literaturverzeichnis

- Anderson, P. L., T. N. Kakuda und K. A. Lichtenstein** (2004). "The cellular pharmacology of nucleoside- and nucleotide-analogue reverse-transcriptase inhibitors and its relationship to clinical toxicities." *Clin Infect Dis* 38(5): 743-53.
- Arastéh K, G. J., Marcus U, Rockstroh J, Salzberger B, Vielhaber B.** (2005, 07.12.2004). "Deutsch-Österreichische Leitlinien zur antiretroviralen Therapie der HIV-Infektion (Teilaktualisierung, Stand Juni 2005)." http://www.rki.de/nn_334606/DE/Content/InfAZ/H/HIVAIDS/Therapie/Leitlinien/D_A_antiretroviral_06_05.html.
- Arnaudo, E., M. Dalakas, S. Shanske, C. T. Moraes, et al.** (1991). "Depletion of muscle mitochondrial DNA in AIDS patients with zidovudine-induced myopathy." *Lancet* 337(8740): 508-10.
- Arnoult, D., F. Petit, J. D. Lelievre und J. Estaquier** (2003). "Mitochondria in HIV-1-induced apoptosis." *Biochem Biophys Res Commun* 304(3): 561-74.
- Bacchetti, P., B. Gripshover, C. Grunfeld, S. Heymsfield, et al.** (2005). "Fat distribution in men with HIV infection." *J Acquir Immune Defic Syndr* 40(2): 121-31.
- Badley, A. D., T. Roumier, J. J. Lum und G. Kroemer** (2003). "Mitochondrion-mediated apoptosis in HIV-1 infection." *Trends Pharmacol Sci* 24(6): 298-305.
- Banas, B., B. P. Kost und F. D. Goebel** (2004). "Platelets, a typical source of error in real-time PCR quantification of mitochondrial DNA content in human peripheral blood cells." *Eur J Med Res* 9(8): 371-7.
- Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, et al.** (1983). "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." *Science* 220(4599): 868-71.
- Böhler, T., J. Walcher, G. Holz-Wenig, M. Geiss, et al.** (1999). "Early effects of antiretroviral combination therapy on activation, apoptosis and regeneration of T cells in HIV-1-infected children and adolescents." *Aids* 13(7): 779-89.
- Boyum, A.** (1984). "Separation of lymphocytes, granulocytes, and monocytes from human blood using iodinated density gradient media." *Methods Enzymol* 108: 88-102.
- Brinkman, K. und T. N. Kakuda** (2000). "Mitochondrial toxicity of nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors: a looming obstacle for long-term antiretroviral therapy?" *Curr Opin Infect Dis* 13(1): 5-11.
- Brinkman, K., J. A. Smeitink, J. A. Romijn und P. Reiss** (1999). "Mitochondrial toxicity induced by nucleoside-analogue reverse-transcriptase inhibitors is a key factor in

- the pathogenesis of antiretroviral-therapy-related lipodystrophy." Lancet 354(9184): 1112-5.
- Brinkman, K., H. J. ter Hofstede, D. M. Burger, J. A. Smeitink, et al.** (1998). "Adverse effects of reverse transcriptase inhibitors: mitochondrial toxicity as common pathway." Aids 12(14): 1735-44.
- Carr, A.** (2003). "HIV lipodystrophy: risk factors, pathogenesis, diagnosis and management." Aids 17 Suppl 1: S141-8.
- Carr, A., K. Samaras, S. Burton, M. Law, et al.** (1998). "A syndrome of peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia and insulin resistance in patients receiving HIV protease inhibitors." Aids 12(7): F51-8.
- Casula, M., M. van der Valk, F. W. Wit, M. A. Nievaard, et al.** (2007). "Mitochondrial DNA assessment in adipocytes and peripheral blood mononuclear cells of HIV-infected patients with lipodystrophy according to a validated case definition." HIV Med 8(1): 32-7.
- Casula, M., G. J. Weverling, F. W. Wit, E. C. Timmermans, et al.** (2005). "Mitochondrial DNA and RNA increase in peripheral blood mononuclear cells from HIV-1-infected patients randomized to receive stavudine-containing or stavudine-sparing combination therapy." J Infect Dis 192(10): 1794-800.
- Chavan, S. J., S. L. Tamma, M. Kaplan, M. Gersten, et al.** (1999). "Reduction in T cell apoptosis in patients with HIV disease following antiretroviral therapy." Clin Immunol 93(1): 24-33.
- Cherry, C. L., L. Lala und S. L. Wesselingh** (2005). "Mitochondrial toxicity of nucleoside analogues: mechanism, monitoring and management." Sex Health 2(1): 1-11.
- Cherry, C. L., D. Nolan, I. R. James, E. J. McKinnon, et al.** (2006). "Tissue-specific associations between mitochondrial DNA levels and current treatment status in HIV-infected individuals." J Acquir Immune Defic Syndr 42(4): 435-40.
- Cherry, C. L. und S. L. Wesselingh** (2003). "Nucleoside analogues and HIV: the combined cost to mitochondria." J Antimicrob Chemother 51(5): 1091-3.
- Chiappini, F., E. Teicher, R. Saffroy, P. Pham, et al.** (2004). "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 84(7): 908-14.
- Chun, T. W., L. Carruth, D. Finzi, X. Shen, et al.** (1997). "Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection." Nature 387(6629): 183-8.

- Clavel, F., D. Guetard, F. Brun-Vezinet, S. Chamaret, et al.** (1986). "Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS." Science 233(4761): 343-6.
- Connolly, G. P. und J. A. Duley** (1999). "Uridine and its nucleotides: biological actions, therapeutic potentials." Trends Pharmacol Sci 20(5): 218-25.
- Copeland, W. C., M. V. Ponamarev, D. Nguyen, T. A. Kunkel, et al.** (2003). "Mutations in DNA polymerase gamma cause error prone DNA synthesis in human mitochondrial disorders." Acta Biochim Pol 50(1): 155-67.
- Cossarizza, A., M. Baccarani-Contri, G. Kalashnikova und C. Franceschi** (1993). "A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1)." Biochem Biophys Res Commun 197(1): 40-5.
- Cossarizza, A. und G. Moyle** (2004). "Antiretroviral nucleoside and nucleotide analogues and mitochondria." Aids 18(2): 137-51.
- Cossarizza, A., C. Mussini, N. Mongiardo, V. Borghi, et al.** (1997). "Mitochondria alterations and dramatic tendency to undergo apoptosis in peripheral blood lymphocytes during acute HIV syndrome." Aids 11(1): 19-26.
- Cossarizza, A., M. Pinti, L. Moretti, D. Bricalli, et al.** (2002). "Mitochondrial functionality and mitochondrial DNA content in lymphocytes of vertically infected human immunodeficiency virus-positive children with highly active antiretroviral therapy-related lipodystrophy." J Infect Dis 185(3): 299-305.
- Cote, H. C.** (2005). "Possible ways nucleoside analogues can affect mitochondrial DNA content and gene expression during HIV therapy." Antivir Ther 10 Suppl 2: M3-11.
- Cote, H. C., Z. L. Brumme, K. J. Craib, C. S. Alexander, et al.** (2002). "Changes in mitochondrial DNA as a marker of nucleoside toxicity in HIV-infected patients." N Engl J Med 346(11): 811-20.
- De Clercq, E.** (2000). "Novel compounds in preclinical/early clinical development for the treatment of HIV infections." Rev Med Virol 10(4): 255-77.
- De Clercq, E.** (2004). "Antiviral drugs in current clinical use." J Clin Virol 30(2): 115-33.
- de Mendoza, C., A. de Ronde, K. Smolders, F. Blanco, et al.** (2004). "Changes in mitochondrial DNA copy number in blood cells from HIV-infected patients undergoing antiretroviral therapy." AIDS Res Hum Retroviruses 20(3): 271-3.
- Doong, S. L., C. H. Tsai, R. F. Schinazi, D. C. Liotta, et al.** (1991). "Inhibition of the replication of hepatitis B virus in vitro by 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine and related analogues." Proc Natl Acad Sci U S A 88(19): 8495-9.

- Fischl, M. A., D. D. Richman, N. Hansen, A. C. Collier, et al.** (1990). "The safety and efficacy of zidovudine (AZT) in the treatment of subjects with mildly symptomatic human immunodeficiency virus type 1 (HIV) infection. A double-blind, placebo-controlled trial. The AIDS Clinical Trials Group." Ann Intern Med 112(10): 727-37.
- Frankel, A. D. und J. A. Young** (1998). "HIV-1: fifteen proteins and an RNA." Annu Rev Biochem 67: 1-25.
- Freed, E. O.** (1998). "HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle." Virology 251(1): 1-15.
- Gallant, J. E., S. Staszewski, A. L. Pozniak, E. DeJesus, et al.** (2004). "Efficacy and safety of tenofovir DF vs stavudine in combination therapy in antiretroviral-naive patients: a 3-year randomized trial." Jama 292(2): 191-201.
- Gallo, R. C., P. S. Sarin, E. P. Gelmann, M. Robert-Guroff, et al.** (1983). "Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." Science 220(4599): 865-7.
- Goebel, F. D.** (2004a). Klinische Manifestationen der HIV-Infektion. Die Infektiologie. D. Adam, H. W. Doerr, H. Link und H. Lode. Berlin Heidelberg New York, Springer-Verlag. **1**: 577-587.
- Goebel, F. D.** (2004b). Therapie der HIV-Infektion. Die Infektiologie. D. Adam, H. W. Doerr, H. Link und H. Lode. Berlin Heidelberg New York, Springer-Verlag. **1**: 587-593.
- Goebel, F. D., A. Roggenkamp und L. Gürtler** (2000). HIV und AIDS. Klinische Infektiologie. R. Marre, T. Mertens, M. Trautmann und E. Vanek. München Jena, Urban und Fischer. **1**: 661 - 694.
- Gougeon, M. L.** (2003). "Apoptosis as an HIV strategy to escape immune attack." Nat Rev Immunol 3(5): 392-404.
- Graziewicz, M. A., B. J. Day und W. C. Copeland** (2002). "The mitochondrial DNA polymerase as a target of oxidative damage." Nucleic Acids Res 30(13): 2817-24.
- Griffiths, E. J.** (2000). "Mitochondria--potential role in cell life and death." Cardiovasc Res 46(1): 24-7.
- Gürtler, L.** (2004). Immunologie von HIV-Infektion und AIDS. Die Infektiologie. D. Adam, H. W. Doerr, H. Link und H. Lode. Berlin Heidelberg New York, Springer-Verlag. **1**: 555-558.
- Hartmann, M.** (2006). "Arzneimittelnebenwirkungen bei antiretroviraler Therapie." Hautarzt 57(11): 969-974.
- Haugaard, S. B., O. Andersen, S. B. Pedersen, F. Dela, et al.** (2005). "Depleted skeletal muscle mitochondrial DNA, hyperlactatemia, and decreased oxidative capacity in

- HIV-infected patients on highly active antiretroviral therapy." J Med Virol 77(1): 29-38.
- Hidalgo, M., M. A. Villalona-Calero, S. G. Eckhardt, R. L. Drengler, et al.** (2000). "Phase I and pharmacologic study of PN401 and fluorouracil in patients with advanced solid malignancies." J Clin Oncol 18(1): 167-77.
- Hoffmann, C.** (2005). Substanzklassen, Medikamentenübersicht. HIV.NET 2005. C. Hoffmann, J. K. Rockstroh und B. S. Kamps. Wuppertal-Beyenburg, Steinhäuser Verlag. **3**: 96-129.
- Hoschele, D.** (2006). "Cell culture models for the investigation of NRTI-induced mitochondrial toxicity. Relevance for the prediction of clinical toxicity." Toxicol In Vitro.
- Jimenez, A., L. Molero, A. Jimenez, S. Castanon, et al.** (2002). "Role of antiretroviral regimes in HIV-1 patients in reducing immune activation." Immunology 106(1): 80-6.
- John, M. und S. Mallal** (2002). "Hyperlactatemia syndromes in people with HIV infection." Curr Opin Infect Dis 15(1): 23-9.
- Johnson, A. A., A. S. Ray, J. Hanes, Z. Suo, et al.** (2001). "Toxicity of antiviral nucleoside analogs and the human mitochondrial DNA polymerase." J Biol Chem 276(44): 40847-57.
- Kakuda, T. N.** (2000). "Pharmacology of nucleoside and nucleotide reverse transcriptase inhibitor-induced mitochondrial toxicity." Clin Ther 22(6): 685-708.
- Koch, E. C., J. Schneider, R. Weis, B. Penning, et al.** (2003). "Uridine excess does not interfere with the antiretroviral efficacy of nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors." Antivir Ther 8(5): 485-7.
- Lewis, W., B. J. Day und W. C. Copeland** (2003). "Mitochondrial toxicity of NRTI antiviral drugs: an integrated cellular perspective." Nat Rev Drug Discov 2(10): 812-22.
- Löffler, G.** (1998a). Elektronentransport und oxidative Phosphorylierung. Biochemie und Pathobiochemie. G. Löffler und P. E. Petrides. Berlin; Heidelberg, Springer. **6**: 496-518.
- Löffler, G.** (1998b). Zelluläre Organellen und Strukturen. Biochemie und Pathobiochemie. G. Löffler und P. E. Petrides. Berlin; Heidelberg, Springer. **6**: 176-201.
- Lopez, S., O. Miro, E. Martinez, E. Pedrol, et al.** (2004). "Mitochondrial effects of antiretroviral therapies in asymptomatic patients." Antivir Ther 9(1): 47-55.

- Maagaard, A., M. Holberg-Petersen, E. A. Kvittingen, L. Sandvik, et al.** (2006). "Depletion of mitochondrial DNA copies/cell in peripheral blood mononuclear cells in HIV-1-infected treatment-naive patients." HIV Med 7(1): 53-8.
- Macho, A., M. Castedo, P. Marchetti, J. J. Aguilar, et al.** (1995). "Mitochondrial dysfunctions in circulating T lymphocytes from human immunodeficiency virus-1 carriers." Blood 86(7): 2481-7.
- Martin, A. M., E. Hammond, D. Nolan, C. Pace, et al.** (2003). "Accumulation of mitochondrial DNA mutations in human immunodeficiency virus-infected patients treated with nucleoside-analogue reverse-transcriptase inhibitors." Am J Hum Genet 72(3): 549-60.
- Mathews, C. K. und K. E. Van Holde** (1996). Biochemistry. Menlo Park, Calif., Benjamin/Cummings Pub. Co., Inc.
- Mathur, A., Y. Hong, B. K. Kemp, A. A. Barrientos, et al.** (2000). "Evaluation of fluorescent dyes for the detection of mitochondrial membrane potential changes in cultured cardiomyocytes." Cardiovasc Res 46(1): 126-38.
- McComsey, G. und J. T. Lonergan** (2004). "Mitochondrial Dysfunction: Patient Monitoring and Toxicity Management." J Acquir Immune Defic Syndr 37: S30-S35.
- McKenzie, R., M. W. Fried, R. Sallie, H. Conjeevaram, et al.** (1995). "Hepatic failure and lactic acidosis due to fialuridine (FIAU), an investigational nucleoside analogue for chronic hepatitis B." N Engl J Med 333(17): 1099-105.
- Miller, V., A. Mocroft, P. Reiss, C. Katlama, et al.** (1999). "Relations among CD4 lymphocyte count nadir, antiretroviral therapy, and HIV-1 disease progression: results from the EuroSIDA study." Ann Intern Med 130(7): 570-7.
- Miro, O., S. Lopez, F. Cardellach und J. Casademont** (2005). "Mitochondrial studies in HAART-related lipodystrophy: from experimental hypothesis to clinical findings." Antivir Ther 10 Suppl 2: M73-81.
- Miro, O., S. Lopez, E. Martinez, E. Pedrol, et al.** (2004). "Mitochondrial effects of HIV infection on the peripheral blood mononuclear cells of HIV-infected patients who were never treated with antiretrovirals." Clin Infect Dis 39(5): 710-6.
- Miura, T., M. Goto, N. Hosoya, T. Odawara, et al.** (2003). "Depletion of mitochondrial DNA in HIV-1-infected patients and its amelioration by antiretroviral therapy." J Med Virol 70(4): 497-505.
- Montaner, J. S., H. C. Cote, M. Harris, R. S. Hogg, et al.** (2003). "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 34 Suppl 1: S85-90.

- Moretti, S., S. Marcellini, A. Boschini, G. Famularo, et al.** (2000). "Apoptosis and apoptosis-associated perturbations of peripheral blood lymphocytes during HIV infection: comparison between AIDS patients and asymptomatic long-term non-progressors." Clin Exp Immunol 122(3): 364-73.
- Moyle, G.** (2000). "Clinical manifestations and management of antiretroviral nucleoside analog-related mitochondrial toxicity." Clin Ther 22(8): 911-36; discussion 898.
- Moyle, G.** (2005). "Mechanisms of HIV and nucleoside reverse transcriptase inhibitor injury to mitochondria." Antivir Ther 10 Suppl 2: M47-52.
- Naviaux, R. K., D. Markusic, B. A. Barshop, W. L. Nyhan, et al.** (1999). "Sensitive assay for mitochondrial DNA polymerase gamma." Clin Chem 45(10): 1725-33.
- Neumeister, B. und J. Brückel** (2003). Klinikleitfaden Labordiagnostik. München, Urban & Fischer.
- Palella, F. J., Jr., S. R. Cole, J. S. Chmiel, S. A. Riddler, et al.** (2004). "Anthropometrics and examiner-reported body habitus abnormalities in the multicenter AIDS cohort study." Clin Infect Dis 38(6): 903-7.
- Petit, F., B. Fromenty, A. Owen und J. Estaquier** (2005). "Mitochondria are sensors for HIV drugs." Trends Pharmacol Sci 26(5): 258-64.
- Phenix, B. N., C. Cooper, C. Owen und A. D. Badley** (2002). "Modulation of apoptosis by HIV protease inhibitors." Apoptosis 7(4): 295-312.
- Polo, R., S. Martinez, P. Madrigal und M. Gonzalez-Munoz** (2003). "Factors associated with mitochondrial dysfunction in circulating peripheral blood lymphocytes from HIV-infected people." J Acquir Immune Defic Syndr 34(1): 32-6.
- Preiser, W. und H. W. Doerr** (2004). Therapie der HIV-Infektion. Die Infektiologie. D. Adam, H. W. Doerr, H. Link und H. Lode. Berlin Heidelberg New York, Springer-Verlag. 1: 544-554.
- Rabing Christensen, E. R., M. Stegger, S. Jensen-Fangel, A. L. Laursen, et al.** (2004). "Mitochondrial DNA levels in fat and blood cells from patients with lipodystrophy or peripheral neuropathy and the effect of 90 days of high-dose coenzyme Q treatment: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study." Clin Infect Dis 39(9): 1371-9.
- Reers, M., T. W. Smith und L. B. Chen** (1991). "J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential." Biochemistry 30(18): 4480-6.
- RKI (Robert Koch Institut)** (2007). "Epidemiologisches Bulletin : November 2007."

- Rubbert, A.** (2005). Pathophysiologie der HIV-Infektion. HIV.NET 2005. C. Hoffmann, J. K. Rockstroh und B. S. Kamps. Wuppertal-Beyenburg, Steinhäuser Verlag. **3**: 58-79.
- Salvioli, S., A. Ardizzoni, C. Franceschi und A. Cossarizza** (1997). "JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess delta psi changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis." FEBS Lett 411(1): 77-82.
- Saraste, M.** (1999). "Oxidative phosphorylation at the fin de siecle." Science 283(5407): 1488-93.
- Sarkar, S., V. Kalia und R. C. Montelaro** (2003). "Caspase-mediated apoptosis and cell death of rhesus macaque CD4+ T-cells due to cryopreservation of peripheral blood mononuclear cells can be rescued by cytokine treatment after thawing." Cryobiology 47(1): 44-58.
- Schedel, I. R. W.** (2004). Pathogenese der HIV-Infektion. Die Infektiologie. D. Adam, H. W. Doerr, H. Link und H. Lode. Berlin Heidelberg New York, Springer-Verlag. **1**: 559-577.
- Schiller, D. S.** (2004). "Identification, management, and prevention of adverse effects associated with highly active antiretroviral therapy." Am J Health Syst Pharm 61(23): 2507-22.
- Shapiro, H. M.** (2000). "Membrane potential estimation by flow cytometry." Methods 21(3): 271-9.
- Sommadossi, J. P., R. Carlisle, R. F. Schinazi und Z. Zhou** (1988). "Uridine reverses the toxicity of 3'-azido-3'-deoxythymidine in normal human granulocyte-macrophage progenitor cells in vitro without impairment of antiretroviral activity." Antimicrob Agents Chemother 32(7): 997-1001.
- Torre, D. und A. Pugliese** (2005). "Pathogenic mechanisms of mitochondrial DNA depletion in patients with HIV-1 infection." Clin Infect Dis 40(6): 905-6.
- UNAIDS (Joint United Nations Programme on HIV/AIDS)** (2007). "AIDS epidemic update : December 2007." "UNAIDS/07.27E / JC1322E". UNAIDS/WHO.
- Venhoff, N., B. Setzer, D. Lebrecht und U. A. Walker** (2002). "Dietary supplements in the treatment of nucleoside reverse transcriptase inhibitor-related mitochondrial toxicity." Aids 16(5): 800-2.
- Verhoeven, A. J., R. Verhaar, E. G. Gouwerok und D. de Korte** (2005). "The mitochondrial membrane potential in human platelets: a sensitive parameter for platelet quality." Transfusion 45(1): 82-9.
- Walker, U. A.** (2004). "Hier ist rasches Handeln angesagt." MMW Fortschr Med 146(1): 65-67.

- Walker, U. A.** (2005). Mitochondriale Toxizität von Nukleosidanaloga. HIV.NET 2005. C. Hoffmann, J. K. Rockstroh und B. S. Kamps. Wuppertal-Beyenburg, Steinhäuser Verlag. **303-312**: 285-292.
- Walker, U. A.** (2006). Mitochondriale Toxizität von Nukleosidanaloga. HIV.NET 2006. C. Hoffmann, J. K. Rockstroh und B. S. Kamps. Wuppertal-Beyenburg, Steinhäuser Verlag: 323-333.
- Walker, U. A., M. Auclair, D. Lebrecht, M. Kornprobst, et al.** (2006). "Uridine abrogates the adverse effects of antiretroviral pyrimidine analogues on adipose cell functions." Antivir Ther 11(1): 25-34.
- Walker, U. A. und N. Venhoff** (2005). "Uridine in the prevention and treatment of NRTI-related mitochondrial toxicity." Antivir Ther 10 Suppl 2: M117-23.
- Walker, U. A., N. Venhoff, E. C. Koch, M. Olschewski, et al.** (2003). "Uridine abrogates mitochondrial toxicity related to nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors in HepG2 cells." Antivir Ther 8(5): 463-70.
- Wallace, D. C.** (1999). "Mitochondrial diseases in man and mouse." Science 283(5407): 1482-8.
- Wasmuth, J. C., F. Hackbarth, J. K. Rockstroh, T. Sauerbruch, et al.** (2003). "Changes of lymphocyte apoptosis associated with sequential introduction of highly active antiretroviral therapy." HIV Med 4(2): 111-9.
- Watters, M. R., P. W. Poff, B. T. Shiramizu, P. S. Holck, et al.** (2004). "Symptomatic distal sensory polyneuropathy in HIV after age 50." Neurology 62(8): 1378-83.
- White, A. J.** (2001). "Mitochondrial toxicity and HIV therapy." Sex Transm Infect 77(3): 158-73.

X. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde an der Infektionsambulanz und Tagesklinik der Medizinischen Poliklinik des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Frank-Detlef Goebel angefertigt.

Besonders danken möchte ich Herrn Dr. med. Thomas Sternfeld für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung. Ohne die vielen Ideen im Vorfeld und während der Arbeit, ohne die interessanten Diskussionen und die Beantwortung meiner Fragen wäre ein schnelles und erfolgreiches Arbeiten nicht möglich gewesen. Dankbar bin ich auch für die kritische Durchsicht des Manuskripts und die angenehme Atmosphäre, ohne die mir die Arbeit im Labor nicht so viel Freude bereitet hätte.

Herrn Prof. Dr. med. Frank-Detlef Goebel danke ich für die Übernahme der Doktorvaterschaft und für die kritische Überprüfung der vorliegenden Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Rudolf Gruber für die technische Unterstützung und die freundliche Hilfestellung bei der Durchführung und Auswertung der Messungen mit dem FACScan.

Herrn Prof. Dr. med. Johannes Bogner, Leiter der Infektionsabteilung der Medizinischen Poliklinik, danke ich für die vielen guten Ratschläge und die freundliche Unterstützung bei der Auswahl der HIV-infizierten Patienten.

Mein Dank geht auch an Frau Dr. rer. nat. Susanne Hillebrand und Herrn Dr. med. Bernd Kost, die mich mit der Arbeit im Labor vertraut gemacht haben.

Weiterhin bedanke ich mich bei den Mitarbeitern der Infektionsambulanz und Tagesklinik der Medizinischen Poliklinik für alle Hilfeleistungen, das gute kollegiale Verhältnis und das freundliche Arbeitsklima.

Für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung möchte ich Frau Regina Hollweck vom Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie am Lehrstuhl für Medizinische Informatik der Technischen Universität München danken.

XI. Publikationen

The influence of HIV infection and antiretroviral therapy on the mitochondrial membrane potential of peripheral mononuclear cells

Sternfeld T, Schmid M, Tischleder A, Mudra S, Schlamp A, Kost BP, Gruber R, Youle M, Bogner JR, Goebel FD;
Antivir Ther. 2007;12(5):769-78

Reduced hepatic mitochondrial function in HIV infected patients with chronic hepatitis analysed using ¹³C-methionine breath test

Sternfeld T, Klose A, Schmid M, Tischleder A, Schuster M, Demmelmair H, Koletzko B, Bogner J, Goebel FD;
8th European Congress of Chemotherapy and Infection / 4th European Congress on Viral Diseases, Budapest, Ungarn, 25. - 28. Oktober 2006

Mitochondrial membrane potential of peripheral mononuclear cells in antiretroviral treated HIV-infected patients with lipodystrophy

Sternfeld T, Schmid M, Tischleder A, Mudra S, Schlamp A, Kost B, Gruber R, Bogner J, Goebel FD;
46th ICAAC, San Francisco, USA, 27. - 30. September 2006

Mitochondrial membrane potential of PBMC is related to immune function in therapy-naïve and antiretroviral-treated HIV infected patients

Sternfeld T, Schmid M, Tischleder A, Mudra S, Kost B, Gruber R, Bogner J, Goebel FD;
XVI International AIDS Conference, Toronto, Kanada, 13. - 18. August 2006

Mitochondrial dysfunction during HIV infection analysed using ¹³C-methionine breath test and JC-1 measurement of mitochondrial membrane potential

Sternfeld T, Schmid M, Klose A, Buselmeier M, Stephani C, Demmelmair H, Koletzko B, Bogner J, Goebel FD;

3rd International AIDS Society Conference on HIV pathogenesis and treatment, Rio de Janeiro, Brasilien, 24. - 27. Juli 2005

Analysis of mitochondrial dysfunction in HIV infection using ¹³C-methionine breath test and JC-1 measurement of mitochondrial membrane potential

Sternfeld T, Klose A, Schmid M, Demmelmair H, Koletzko B, Bogner J, Goebel FD;

Deutsch-Österreichischer Aids-Kongress, Wien, Österreich, 1. - 4. Juni 2005

XII. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Mathias Schmid
Geburtsdatum	30.07.1980
Geburtsort	München
Eltern	Dr. Hans-Georg und Inge Schmid
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schulausbildung

1987 – 1991	Grundschule Sauerlach
1991 – 2000	Gymnasium Oberhaching

Zivildienst

2000 – 2001	Städtisches Krankenhaus München-Neuperlach
-------------	--

Hochschulausbildung

2001 – 2003	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
2003	Ärztliche Vorprüfung
2003 – 2008	Studium der Humanmedizin an der Technischen Universität München
2008	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung