

Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie  
der Universität Würzburg

Vorstand: Herr Prof. Dr. med. Lars Dölken und Herr Prof. Dr. rer. nat. Thomas Hünig

**Virologische und Immunologische Korrelate mit HAND  
bei HIV- Patienten aus Tansania**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Katja Engels  
aus Kassel

Würzburg, November 2015



**Referent:** Herr Prof. Dr. rer. nat. Carsten Scheller

**Koreferent:** Herr Prof. Dr. med. Klaus-Peter Lesch

**Dekan:** Herr Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 30.01.2017

Die Promovendin ist Ärztin

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	1
<b>1.1 HIV</b> .....	2
1.1.1 Struktur und genetische Ausstattung von HIV .....	2
1.1.2 Pathogenese der HIV-Infektion .....	4
1.1.3 Klinischer Verlauf der HIV- Infektion .....	6
1.1.4 Typen und Subtypen des HI-Virus.....	9
1.1.5 Antiretrovirale Therapie (ART) .....	12
<b>1.2 HIV-1 assoziierte neurokognitive Störung (HAND)</b> .....	14
1.2.1 Klinik und Stadien von HAND .....	14
1.2.2 Pathogenese und Risikofaktoren .....	15
1.2.4 Therapie .....	19
<b>1.3 Immunaktivierung</b> .....	20
1.3.1 Immunaktivierungsmarker suPAR.....	20
1.3.2 Immunaktivierungsmarker human LBP .....	21
<b>1.4 Genetische Polymorphismen</b> .....	22
1.4.1 DAT-Polymorphismus .....	23
<b>1.5 Zielsetzung</b> .....	24
<b>2. Material</b> .....	27
2.1. Geräte.....	27
2.2 Verbrauchsmaterialien .....	28

2.3 Chemikalien.....	29
2.4 Enzyme .....	29
2.5 Reaktionskomplettausstattungen (Kits).....	29
2.6 Puffer und Lösungen .....	30
2.7 Computersoftware und Internetseiten.....	30
2.8 Längenstandards .....	31
2.9 Primer .....	31
2.10 Blut- und Plasmaproben .....	33
<b>3. Methoden.....</b>	<b>34</b>
<b>3.1 Vorbereitung der Patienten-Proben.....</b>	<b>34</b>
<b>3.2 Bestimmung des DAT-Polymorphismus .....</b>	<b>34</b>
3.2.1 Isolierung der Patienten- DNA .....	34
3.2.2 Photometrische Messung der DNA- Konzentration (NanoDrop) .....	35
3.2.3 Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR).....	36
3.2.4 Durchführung der PCR zur Bestimmung des DAT-Polymorphismus .....	38
3.2.5 Agarosegelelektrophorese.....	39
<b>3.3 Bestimmung des HIV-Protease Subtyps .....</b>	<b>40</b>
3.3.1 Isolierung der HIV- RNA .....	40
3.3.2 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	42
3.3.3 Nested PCR .....	43
3.3.4 Reinigung von PCR Produkten .....	44
3.3.5 Sequenzierung .....	45
<b>3.4 Bestimmung der Immunaktivierung mittels ELISA.....</b>	<b>46</b>
3.4.1 Prinzip des ELISA.....	47
3.4.2 Bestimmung der suPAR Werte mittels ELISA .....	48

3.4.3 Bestimmung der human LBP Werte mittels ELISA .....	49
<b>3.5 Statistik und graphische Darstellung der Ergebnisse .....</b>	<b>50</b>
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>52</b>
<b>4.1 Studien- und Patientenbeschreibung .....</b>	<b>52</b>
<b>4.2 Verteilung des genetischen Polymorphismus DAT in HIV-Patienten aus Tansania und in der Kontrollgruppe .....</b>	<b>53</b>
<b>4.3 Verteilung der HIV-Protease Subtypen in HIV-Patienten aus Tansania .....</b>	<b>56</b>
<b>4.4 Immunaktivierung in HIV-Patienten aus Tansania im Vergleich mit der Kontrollgruppe .....</b>	<b>58</b>
4.4.1 Konzentrationen des Immunaktivierungsmarker suPAR in HIV-Patienten und in der Kontrollgruppe .....	58
4.4.2 Konzentrationen des Immunaktivierungsmarker human LBP in HIV- Patienten und in der Kontrollgruppe .....	60
4.4.3 Korrelation zwischen den Konzentrationen der Immunaktivierungsmarkers suPAR und human LBP .....	62
<b>4.5 Korrelationen zwischen den Subtypen der HIV-Protease und der Immunaktivierung .....</b>	<b>62</b>
<b>4.6 Korrelationen zwischen den Subtypen der HIV-Protease und den Ergebnissen der neuropsychologischen Tests .....</b>	<b>64</b>
<b>4.7 Korrelationen zwischen der Immunaktivierung und den Ergebnissen der neuropsychologischen Tests .....</b>	<b>67</b>
4.7.1 Korrelationen zwischen den suPAR-Werten und den Ergebnissen der neuropsychologischen Tests .....	67
4.7.1.1 Korrelationen zwischen den suPAR-Werten und den IHDS-Ergebnissen .....	67
4.7.1.2 Korrelationen zwischen den suPAR-Werten und den MMS-Ergebnissen .....	70

4.7.1.3 Korrelationen zwischen den suPAR-Werten und den Verbal-Fluency-Test- Ergebnissen.....	73
4.7.1.4 Korrelationen zwischen den suPAR-Werten und den Digit-Span-Test- Ergebnissen.....	75
4.7.1.5 Korrelationen zwischen den suPAR-Werten und den Pictorial-Sleepiness-Scale-Ergebnissen.....	75
4.7.2 Korrelationen zwischen den human LBP-Werten und den Ergebnissen der neuropsychologischen Tests .....	76
4.7.2.1 Korrelationen zwischen den human LBP-Werten und den IHDS- Ergebnissen.....	76
4.7.2.2 Korrelationen zwischen den human LBP-Werten und den MMS- Ergebnissen.....	80
4.7.2.3 Korrelationen zwischen den human LBP-Werten und den Verbal- Fluency-Test-Ergebnissen.....	82
4.7.2.4 Korrelationen zwischen den human LBP-Werten und den Digit-Span- Test-Ergebnissen.....	83
<b>4.8 Korrelationen mit dem genetischen Polymorphismus DAT .....</b>	<b>84</b>
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>85</b>
<b>5.1 HIV-Protease Subtyp.....</b>	<b>85</b>
5.1.1 Verteilung der HIV-Protease Subtypen in HIV-Patienten aus Tansania .....	85
5.1.2 HIV-Protease Subtyp A als Risikofaktor für HAND .....	86
5.1.3 HIV-Protease Subtyp C geht mit niedrigerer Immunaktivierung einher .....	88
<b>5.2 Immunaktivierung.....</b>	<b>89</b>
5.2.1 Höhere Immunaktivierung in HIV-Patienten als in Kontrollpersonen .....	89
5.2.2 ART hat bei HIV-Patienten aus Tansania keinen Einfluss auf die Immunaktivierung .....	89
5.2.3 Hohe Immunaktivierung als Risikofaktor für HAND .....	90

<b>5.3 DAT-Polymorphismus</b> .....	91
5.3.1 HIV-Patienten und Kontrollpersonen weisen keine Unterschiede in der Verteilung der DAT-Polymorphismen auf .....	92
5.3.2 DAT-Polymorphismus hat keinen Einfluss auf die Entwicklung von HAND93	
5.3.3 DAT-Polymorphismus hat keinen Einfluss auf die Höhe der Immunaktivierung .....	93
 <b>6. Zusammenfassung</b> .....	 95

## **Literaturverzeichnis**

## **Danksagung**

## **Lebenslauf**

## Abkürzungsverzeichnis

AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
ANI	Asymptomatic Neurocognitive Impairment
ART	Antiretrovirale Therapie
bp	Basenpaare
bzw.	Beziehungsweise
CCR5	C-C Chemokine Receptor Type 5
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic acid
CRF	Circulating Recombinant Form
CXCR4	C-X-C Chemokine Receptor Type 4
DAT	Dopamintransporter
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddH <sub>2</sub> O	Double Distilled Water
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-Triphosphate
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dH <sub>2</sub> O	Distilled Water
DNA	Deoxyribonucleic acid
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEG	Elektroenzephalographie
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
env	Envelope
fwd	Forward
g	Gramm
gag	Group Specific Antigen
ggf.	gegebenenfalls
gp	Glykoprotein
GPI-Anker	Glycosylphosphatidylinositol-Anker

HAD	HIV Associated Dementia
HAND	HIV Associated Neurocognitive Disorders
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HPV	Humanes Papillomavirus
IHDS	Internationale HIV-Demenz Skala
INI	Integrase-Inhibitor
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LBP	Lipopolysaccharid Bindungs-Protein
LPS	Lipopolysaccharid
LTR	Long Terminal Repeats
M	Molare Masse
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein 1
Mg	Magnesium
min	Minuten
ml	Milliliter
MMS	Mini Mental Status
MND	Mild Neurocognitive Disorder
mV	Milivolt
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NNRT	Nicht-nukleosidischer Reverse-Transkriptase-Inhibitor
NRT	Nukleosidischer Reverse-Transkriptase-Inhibitor
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PCR	Polymerasekettenreaktion
PI	Protease-Inhibitor
pol	Polymerase-Gen
PSS	Pictorial Sleepiness Scale
rev	Reverse
RNA	Ribonucleic acid
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
sek	Sekunden

SIV	Simianes Immundefizienz Virus
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
s.o.	siehe oben
suPAR	Soluble Urokinase Plasminogen Activating Receptor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
TRIS	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter Anderem
UNAIDS	Joint United Nations Programme on HIV/AIDS
uPA	Urokinase-type Plasminogen Activator
uPAR	Urokinase Plasminogen Activating Receptor
U/min	Umdrehungsfrequenz
UV	Ultraviolett
VNTR	Variable Number Tandem Repeats
WHO	World Health Organisation
ZNS	Zentrales Nervensystem
z.B.	zum Beispiel
$\mu$ l	Mikroliter

## 1. Einleitung

Im Jahr 1981 registrierten die amerikanischen Gesundheitsbehörden eine ungewöhnliche Häufung von opportunistischen Infektionen, wie *Pneumocystis jirovecii* (früher *p. carinii*) Pneumonien, Kandidosen und Kaposi-Sarkomen, bei jungen, homosexuellen, zuvor gesunden Männern (Centers for Disease Control and Prevention, 1981). Diese Erkrankungen treten sonst nur bei immunsupprimierten Patienten auf. Bei der Blutuntersuchung wurde bei allen Betroffenen eine Verminderung der T-Helferzellen und somit ein zellulärer Immundefekt festgestellt (Gottlieb et al., 1981; Masur et al., 1981). Wenig später wurden die Symptome auch bei heterosexuellen Frauen und Männern sowie Kindern beobachtet. Das Krankheitsbild erhielt den Name *acquired immunodeficiency syndrome* (AIDS).

Zwei Jahre nach der Erstbeschreibung des erworbenen Immundefektsyndroms AIDS wurde im Jahr 1983 das Humane Immundefizienz-Virus (HIV) als Erreger dieser Krankheit identifiziert (Barré-Sinoussi et al., 1983; Gallo et al., 1984).

Seither hat sich die HIV-Infektion zu einer weltweiten Pandemie entwickelt, die nach Schätzungen der World Health Organisation (WHO) und der Organisation UNAIDS (Joint United Nations Programme on HIV/AIDS) bislang 36 Millionen Menschen das Leben gekostet hat. Weltweit lebten im Jahr 2012 laut UNAIDS 35,3 Millionen Menschen mit einer HIV-Infektion und etwa 1,6 Millionen Menschen starben im Laufe des Jahres an AIDS. Damit ist die Zahl der AIDS-assoziierten Todesfälle im Vergleich zu 2,3 Millionen im Jahr 2005 deutlich zurückgegangen, was u.a. auf einen breiteren Zugang zu der Antiretroviralen Therapie (ART) zurückgeführt wird. Auch die Zahl der Neuinfektionen nahm von 2001 bis 2012 um 33% auf 2,3 Millionen pro Jahr ab (UNAIDS, 2013). Trotz dieser Entwicklungen bleibt die HIV-Pandemie eine globale Herausforderung, denn obwohl hochwertige Therapiekonzepte entwickelt wurden, die das Fortschreiten der Erkrankung über Jahre hinweg verhindern können, ist eine Heilung bis heute nicht möglich (s. 1.1.5).

Vor allem in bestimmten Regionen der Welt, wie z.B. Subsahara-Afrika, wo die notwendigen Medikamente aufgrund von Armut und der Struktur des Gesundheitssystems noch immer nicht allen Patienten zur Verfügung stehen, stellt die Erkrankung und ihre gesellschaftlichen sowie wirtschaftlichen Folgen ein gravierendes

Problem dar. Schätzungen der UNAIDS zufolge lebten im Jahr 2012 69% aller HIV-Infizierten in Subsahara-Afrika. Auch die Vereinigte Republik Tansania zählt mit 1,5 Millionen HIV-Infizierten zu den Ländern mit besonders hoher HIV-Prävalenz (7.5% Prävalenz unter den 15-49-Jährigen) (UNAIDS, 2013).

Neben den AIDS-definierenden opportunistischen Infektionen spielen HIV-assoziierte neurokognitive Störungen (HAND) eine wichtige Rolle im Krankheitsverlauf der HIV-Infektion. Unbehandelt erkranken etwa 15-20% der HIV-Infizierten an einer HIV-Demenz (McArthur, 2004). Zwar ist die Prävalenz der HIV-Demenz nach der Einführung der antiretroviralen Therapie im Jahr 1996 zurückgegangen, jedoch stellen mildere neurokognitive Störungen noch immer ein großes Problem dar (Sacktor et al., 2002). Die Therapie scheint die neurokognitiven Störungen nicht in demselben Maße unterbinden zu können wie andere AIDS definierende Krankheiten (Dore et al., 1999). Um eine effektive Behandlung von HAND zu ermöglichen, kommt daher der ausführlichen Erforschung der bis heute noch in weiten Teilen unverstandenen Mechanismen, die zur der Entstehung von HAND führen, eine hohe Bedeutung zu.

## **1.1 HIV**

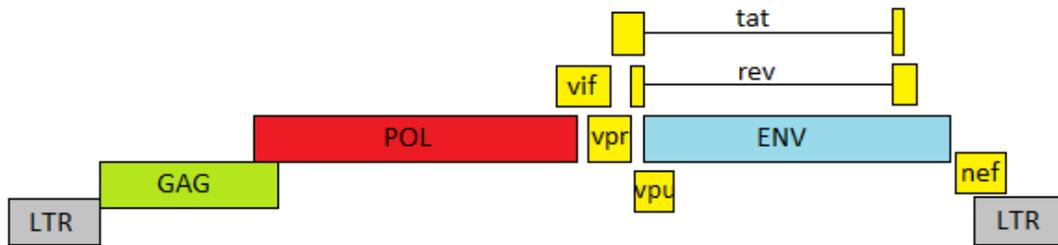
### **1.1.1 Struktur und genetische Ausstattung von HIV**

HIV gehört zu der Gattung der Lentiviren, die wiederum zu der Familie der Retroviren gezählt werden. Charakterisierend für Retroviren ist deren RNA-Genom, das mit Hilfe der viruseigenen Reversen Transkriptase im Zytoplasma der infizierten Zelle in eine DNA-Kopie umgeschrieben wird. Nach Transport dieser neu synthetisierten DNA in den Zellkern wird sie dort von einem weiteren viruseigenen Enzym, der Integrase, in die zelluläre DNA eingebaut, so dass die DNA-Kopie des viralen Genoms zum Bestandteil des Wirtsgenoms wird. Das integrierte HIV-Genom wird nun wie ein zelluläres Gen von der RNA-Polymerase der Wirtszelle transkribiert, wodurch Messenger-RNA entsteht, welche die Voraussetzung für die Synthese neuer viraler Proteine darstellt (Hahn, Kaufmann, Schulz, & Suerbaum, 2008).

Die etwa 100nm großen HIV-Partikel bestehen aus einem konischen Kapsid, welches zwei Kopien der HIV-RNA enthält. Wie alle Lentiviren sind die HIV-Partikel von einer

Lipoproteinhülle umgeben. Diese enthält zwei virale Glykoproteine: gp120, das an der Oberfläche lokalisiert ist und mit den zellulären Rezeptoren für HIV in Wechselbeziehung tritt, und gp41, das transmembran liegt und für die Verschmelzung der Virushülle mit der Zellmembran notwendig ist. An der Innenseite der Virushülle ist das p17-Matrixprotein lokalisiert. Das konische Kapsid wird aus dem p24-Protein gebildet und die darin enthaltenen zwei Kopien der viralen RNA sind an die Nukleokapsidproteine p6 und p7 sowie an die Reverse Transkriptase gebunden. Neben der Reversen Transkriptase enthält das Viruspartikel zwei weitere Enzyme für die Virusvermehrung: die Integrase und die Protease (Wyatt & Sodroski, 1998; Hahn, Kaufmann, Schulz, & Suerbaum, 2008). Die Zahlen in den Proteinnamen stehen für das Molekulargewicht in Kilodalton (kDa).

Das HIV-Genom besteht aus etwa 9,2 Kilobasen (kb) und codiert in offenen Leserastern für insgesamt 15 Proteine (s. Abbildung 1.1). Die Organisation des HIV-Genoms entspricht dem klassischen Aufbauschema eines retroviralen Genoms: 5'LTR – gag - pol – env – LTR3'. Die flankierenden Long Terminal Repeats (LTR) werden bei der Integration des viralen Genoms in das Wirtsgenom mit der zellulären DNA verbunden und regulieren die virale Genexpression und damit die virale Replikation. Das durch das gag-Gen (gag steht für group specific antigen) codierte Gag-Vorläuferprotein pr55 wird durch die virale Protease in die vier Strukturproteine p17 (Matrixprotein), p24 (Kapsidprotein), p7 und p6 (Nukleokapsidproteine) gespalten. Das env-Gen (env steht für envelope) codiert für das Env-Vorläuferprotein gp160, aus dem ebenfalls durch proteolytische Spaltung die beiden Glykoproteine gp120 und gp41 für die Virushülle entstehen. Die Reverse Transkriptase sowie die Integrase und die Protease werden durch das pol-Gen (pol steht für polymerase) codiert. Außer diesen für einen Retrovirus typischen Genen besitzt das HIV-Genom sechs weitere Gene: tat, rev, nef, vif, vpr und vpr. Die Gene tat und rev codieren für zwei Regulator-Proteine, die für die virale Genexpression und somit für die virale Vermehrung wichtig sind. Die anderen vier Gene werden als akzessorische Gene bezeichnet und haben ebenfalls unterschiedliche regulatorische Funktionen im Lebenszyklus von HIV (Hahn et al., 2008; Kayser et al., 2010).



GAG = group specific antigen:

p17  
p24  
p7  
p6

POL = polymerase:

Protease  
Reverse Transkriptase  
Integrase

ENV = envelope:

gp120  
gp41

**Abbildung 1.1:** Genomaufbau von HIV-1. Das HIV-1-Genom codiert für 15 Proteine: das Gen gag für 4 strukturelle Kernproteine (p17, p24, p7, p6), das Gen pol für 3 Enzyme (Protease, Reverse Transkriptase, Integrase), das Gen env für 2 Hüllglykoproteine (gp120, gp41) und 6 weitere Gene für 6 Regulatur-Proteine (tat, rev, nef, vif, vpu, vpr) (Abbildung nach Löffler, Petrides, & Heinrich, 2007).

### 1.1.2 Pathogenese der HIV-Infektion

HIV kann durch ungeschützten Sexualkontakt, parenteral durch kontaminiertes Blut oder Blutprodukte sowie pränatal, perinatal oder postnatal von der Mutter auf das Kind übertragen werden. Für die Wahrscheinlichkeit einer Infektion ist unter anderem die Menge des Virus (Viruslast) in den übertragenden Medien Sperma, Vaginalsekret, Blut, Plasma, Serum und Muttermilch ausschlaggebend. Allerdings kann es auch in seltenen Fällen selbst bei nicht nachweisbarer Viruslast unter antiretroviraler Therapie zu einer Übertragung des HI-Virus kommen (Stürmer, Doerr, Berger, & Gute, 2008; Wilson, Law, Grulich, Cooper, & Kaldor, 2008).

Im Falle einer Übertragung infiziert HIV zunächst die dendritischen Zellen in der Mukosa. Über die dendritischen Zellen gelangt das Virus in die regionären Lymphknoten,

wo es die dort vorhandenen T-Helferzellen infizieren kann. Von den Lymphknoten breitet sich das Virus weiter aus und gelangt zur Vermehrung in lymphatische Organe wie die Milz und die Tonsillen, aber auch in das Gehirn und andere Organe. Bei der Infektion einer Zelle dient das CD4-Molekül auf der Zelloberfläche als Hauptrezeptor für das Virus. Als Korezeptor dienen je nach Tropismus des Virus die Chemokinrezeptoren CCR5 und/oder CXCR4, die u.a. auf Lymphozyten und Monozyten exprimiert werden. Während in der Frühphase der HIV-Infektion meist die CCR5-tropen Viren überwiegen, kommen in der Spätphase auch immer mehr CXCR4-trope Viren vor. Die Bindung des HI-Virus mit dem äußeren Hüllglykoprotein gp120 an den Haupt- und den jeweiligen Korezeptor führt zu einer Konformationsänderung, wodurch die Fusionsdomäne des Glykoproteins gp41 freigesetzt wird und es zu einer Verschmelzung der Virushülle mit der Plasmamembran kommt. Nach Fusion der Virushülle mit der Zellmembran synthetisiert die viruseigene Reverse Transkriptase eine doppelsträngige DNA-Kopie des viralen RNA-Genoms. Diese Kopie wird anschließend in der Zellkern transportiert und durch die viruseigene Integrase in das Wirtsgenom eingebaut. Die Transkription des HIV-Genoms erfolgt durch die zelluläre RNA-Polymerase. Die Transkripte werden zum Teil im Zytoplasma der Wirtszelle translatiert, sodass die einzelnen Bestandteile für die neuen Viruspartikel entstehen. Ein anderer Teil der Transkripte wird auch direkt als neue Virus-RNA in die neuen Viruspartikel eingebaut. Nach dem Zusammenbau aller Bestandteile werden die Viren aus der Wirtszelle freigesetzt und können neue Zellen infizieren.

Neben CD4-positiven T-Helferzellen und dendritischen Zellen können auch andere CD4-positive Zellen von HIV infiziert werden. Hierzu zählen vor allem die aus Monozyten hervorgehenden Makrophagen und Mikrogliazellen. Über Letztere kann das HI-Virus in das zentrale Nervensystem (ZNS) gelangen. All diese CD4-positiven Zellen sind für die Präsentation und Erkennung von Antigenen zuständig und somit wichtige Induktoren einer adaptiven Immunantwort, die in Folge einer Infektion dieser Zellen mit HIV gestört ist. Die stetige Replikation des HI-Virus in den CD4-positiven T-Helferzellen führt zur deren Vernichtung. Nicht nur die direkten Effekte der HIV-Replikation zerstören die CD4-T-Zellen, sondern auch zytotoxische T-Zellen, die im Rahmen der Immunantwort auf die HIV-Infektion gebildet werden, führen zum Zelltod. Zunächst kann diese Zerstörung durch Bildung neuer CD4-T-Zellen aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark kompensiert werden, bevor es dann zu einer kontinuierlichen Abnahme der

CD4-T-Zellzahl kommt. Der Verlust der CD4-T-Zellen, denen eine zentrale Rolle in der Immunantwort zukommt, führt im Verlauf der Erkrankung zu einer Schwächung des Immunsystems und schließlich zum Vollbild des erworbenen Immundefizienz-Syndroms AIDS mit lebensbedrohlichen opportunistischen Infektionen und Malignomen (s. 1.1.3). Das HI-Virus kann in infizierten Zellen auch in einem latenten Zustand persistieren. Hierbei liegt das Virus-Genom integriert in dem Wirtsgenom vor, ohne dass eine Virus-Replikation stattfindet. In diesem Zustand entzieht sich das Virus der Wirkung der HIV-Medikamente, weshalb eine vollständige Elimination des Virus bis heute nicht möglich ist. Eine Reaktivierung der Viren in latent infizierten Zellen und der Wiedereintritt in den Replikationszyklus ist möglich (Hahn et al., 2008; Kayser et al., 2010).

Eine Infektion mit HIV löst eine starke Immunantwort aus, bei der sowohl zelluläre als auch humorale Komponenten beteiligt sind. Eine wichtige Rolle spielt die CD8-T-Zellantwort. Diese zytotoxischen T-Zellen erkennen infizierte Zellen, in denen eine Virusreplikation stattfindet, und bewirken deren Zelltod. Hierdurch kommt es zu einem Abfall der initial sehr hohen Viruslast von typischerweise  $10^6$ - $10^7$  Virionen pro Milliliter Blutplasma auf etwa  $10^3$ - $10^4$ . In der sich anschließenden klinisch asymptomatischen Phase, die sich über Jahre erstrecken kann, bleibt die Viruslast auf diesem relativ niedrigen Niveau stabil und steigt erst in der Phase AIDS wieder auf höhere Werte an. Während der klinisch asymptomatischen Phase kommt es jedoch zu einem Abfall der CD4-T-Zellzahl (s.o.), so dass es schließlich zu einer eingeschränkten Immunkompetenz kommt, die nach etwa 10 Jahren in das Stadium AIDS übergeht. Auch die gegen das HI-Virus gebildeten Antikörper, die ab einem Zeitpunkt von ein bis drei Monate nach der Infektion nachweisbar sind, erreichen keine Elimination des Virus. Eine chronische Immunaktivierung bleibt über den gesamten Krankheitsverlauf bestehen und wird als ursächlich für das Fortschreiten der HIV-Infektion bis ins AIDS-Stadium angesehen (Hahn et al., 2008; Ostrowski, 2010).

### **1.1.3 Klinischer Verlauf der HIV- Infektion**

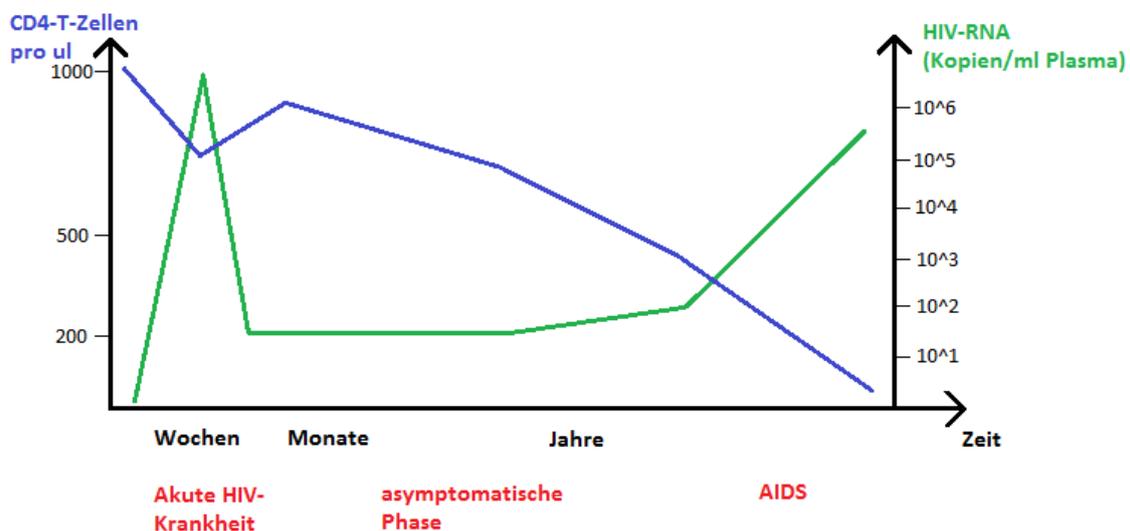
Der klinische Verlauf einer HIV-Infektion lässt sich in drei Phasen unterteilen: die akute Phase, die asymptomatische Phase und die symptomatische AIDS-Phase (s. Abbildung 1.2).

Etwa 30% der HIV-Infizierten entwickeln ein bis sechs Wochen nach der Infektion ein so genanntes akutes retrovirales Syndrom, welches meist nicht länger als 14 Tage andauert. Die Leitsymptome sind Fieber, Abgeschlagenheit, Lymphknotenschwellung, Splenomegalie, Halsschmerzen, Muskel- und Gelenkschmerzen sowie ein makulopapulöses Exanthem und ähneln somit dem Krankheitsbild einer infektiösen Mononukleose (Herold, 2013). Auch gastrointestinale Symptome, Schleimhautulzerationen und neurologische Symptome in Form von Kopfschmerzen, Meningitis oder Neuropathie zählen zu den möglichen Erstsymptomen einer HIV-Infektion (Vanhems & Beaulieu, 1997). Dieses akute Stadium der Erkrankung zeichnet sich durch eine starke Vermehrung des HI-Virus in den CD4-T-Zellen und dem entsprechend einer sehr hohen Viruslast aus. Die massive Virusreplikation führt zu einer Zerstörung der CD4-T-Zellen und somit zu einer Abnahme der CD4-T-Zellzahl im peripheren Blut. Nach einigen Tagen kommt es durch die Immunantwort des Wirts zu einem interindividuell unterschiedlich starkem Abfall der Viruslast im Blut und die CD4-T-Zellzahl steigt zunächst wieder an (s. 1.1.2). Während der akuten Phase der HIV-Infektion ist die Diagnosestellung auf Grund der unspezifischen Symptome, die sehr variabel ausgeprägt sein können, schwierig. Eine Verdachtsdiagnose wird mit einem ELISA-Suchtest erhärtet, in dem sowohl HIV-Antigen als auch anti-HIV-Antikörper parallel nachgewiesen werden. Ein reaktiver Testbefund wird mit einem Western-Blot bestätigt.

An die akute Phase schließt sich eine im Mittel etwa 10 Jahre andauernde asymptomatische Phase an. Während dieser Latenzphase findet weiterhin eine Virusvermehrung statt, weshalb die Patienten trotz Symptomfreiheit infektiös bleiben. Mit der Zeit nimmt die CD4-T-Zellzahl kontinuierlich ab (s. 1.1.2), sodass es zum Fortschreiten der Erkrankung in die dritte Phase, die symptomatische AIDS-Phase kommt (Herold, 2013).

Der durch die Abnahme der CD4-T-Zellzahlen entstehende Immundefekt führt zu unterschiedlichen Symptomen, die zunächst noch nicht AIDS definierend sind. Subfebrile Temperaturen, Leistungsverminderung, Gewichtsverlust, chronische Diarrhöen, Hautveränderungen durch Herpes Zoster, Schleimhautinfektionen mit *Candida albicans* sowie periphere Neuropathie gehören zu den häufigen Symptomen dieser Phase (Centers for Disease Control and Prevention, 1992).

Fällt die CD4-T-Zellzahl unter 200 Zellen/ $\mu$ l (der Normwert liegt zwischen 800 und 1200 Zellen/ $\mu$ l) steigt das Risiko für den Übergang in das Vollbild der AIDS-Erkrankung. Charakterisierend ist das Auftreten von so genannten AIDS definierenden Erkrankungen. Hierzu zählen lebensbedrohliche opportunistische Infektionen wie z.B. die Pneumocystis-jiroveci Pneumonie, die zerebrale Toxoplasmose, die Candidose von Ösophagus, Bronchien, Trachea und Lunge sowie die HIV-assoziierte Enzephalopathie. Zu den AIDS definierenden Erkrankungen gehören auch bösartige Neubildungen, dazu gehören unter anderem das B-Zell-Lymphom, das Kaposi-Sarkom und Humane Papilloma-Viren (HPV)-assoziierte Zervix- und Analkarzinome. Im Verlauf der HIV-Erkrankung treten auch zunehmend neurologische Komplikationen auf, die sich zur HIV-Demenz entwickeln können (s. 1.2). Unbehandelt endet die AIDS-Erkrankung letal. Jedoch kann durch einen frühzeitigen Beginn mit der antiretroviralen Therapie das Auftreten klinischer Manifestationen unterdrückt und eine fast normale Lebenserwartung erreicht werden (Centers for Disease Control and Prevention, 1992; Herold, 2013).



**Abbildung 1.2:** Verlauf der unbehandelten HIV-Infektion. Die HIV-Infektion lässt sich klinisch in drei Phasen unterteilen: akute Infektion, asymptomatische Phase und AIDS-Phase. Dargestellt sind die Lymphozytenzahl (CD4-T-Zellen) und die Viruslast im Verlauf der Erkrankung (Abbildung nach Herold, 2013).

### 1.1.4 Typen und Subtypen des HI-Virus

Drei Jahre nach der Entdeckung des HI-Virus im Jahr 1983 wurde ein weiteres Retrovirus aus einem westafrikanischen AIDS-Patienten isoliert und erhielt den Namen HIV-2 (Clavel et al., 1986). Das zuerst entdeckte Virus wurde als HIV-1 bezeichnet. HIV-1 ging aus einer Übertragung von SIV (Simianes Immundefizienz Virus) des Schimpansen auf den Menschen hervor, während HIV-2 von einem SIV-Stamm des Mangabenaffen entstanden ist (Sharp, Bailes, Robertson, Gao, & Hahn, 1999).

Neben der gemeinsamen Abstammung von SIV, weisen die beiden Typen HIV-1 und HIV-2 weitere Gemeinsamkeiten auf: morphologisch sind sie nicht voneinander zu unterscheiden und auch das durch sie verursachte klinische Krankheitsbild, dessen Endstadium AIDS tödlich endet, ähnelt sich sehr. Allerdings gibt es auch einige Unterschiede zwischen HIV-1 und HIV-2. So bestehen zum einen, obwohl das Genom von HIV-1 und HIV-2 den gleichen retroviralen Grundaufbau aufweist, starke Differenzen in der Basensequenz. Zum anderen sind beachtliche Unterschiede in der Infektiösität und Pathogenität vorhanden, die bei HIV-1 ausgeprägter sind als bei HIV-2. Bei einer Infektion mit HIV-1 kommt es ohne Therapiemaßnahmen deutlich schneller zu einem Erreichen des AIDS-Stadiums. Die CD4-Zellzahlen sind bei einer Infektion mit HIV-1 meist niedriger und die Viruslast sowie die Immunaktivierung höher als bei einer Infektion mit HIV-2. Die Mechanismen, die zu dieser unterschiedlich starken Infektiösität und Pathogenität führen, sind noch nicht vollständig verstanden. Ein Ansatzpunkt sind die Unterschiede in der Immunantwort des Wirts, die im Fall einer Infektion mit HIV-2 die Progression der Erkrankung effektiver aufzuhalten scheint. Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Virus-Typen besteht in der Epidemiologie. Während HIV-2 nur in einigen Regionen Westafrikas vorkommt und für weniger als 1% aller HIV-Infektion verantwortlich ist, stellt HIV-1 den Erreger der weltweiten HIV-Epidemie dar (Nyamweya et al., 2013).

Die Typen HIV-1 und HIV-2 werden nach ihrer phylogenetischen Verwandtschaft weiter in Gruppen unterteilt. Von HIV-2 existieren die Gruppen A-H und von HIV-1 die Gruppen M (major), O (outlier), N (non-M, non-O) und P, die jeweils auf voneinander getrennte Transmissionsereignisse zurückgehen. Die mit Abstand bedeutendste Gruppe M umfasst

neun Subtypen und ist Auslöser für die überwiegende Mehrzahl der weltweiten HIV-Infektionen. Infektionen mit den Gruppen N, O und P, die nicht weiter in Subtypen unterteilt werden, treten nur selten in begrenzten Gebieten in Westafrika auf (Herold, 2013).

Die neun Subtypen der HIV-1 Gruppe M sind A, B, C, D, F, G, H, J und K, wobei A und F noch weiter in die Sub-Subtypen A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub> sowie F<sub>1</sub> und F<sub>2</sub> unterteilt werden. Durch Superinfektionen und daraus resultierenden Rekombinationen hat sich außerdem eine Vielzahl von rekombinanten Stämmen entwickelt, die endemisch sind. Die Subtypen der Gruppe M haben sich in der Frühphase der Epidemie der Gruppe M gebildet (Faria et al., 2014). Die genetische Heterogenität zwischen den Subtypen beträgt 25% bis 35%. Die Sequenzen innerhalb eines Subtyps oder Subsubtyps sind entsprechend näher miteinander verwandt, wobei auch hier noch eine genetische Heterogenität von 15% bis 20% bestehen kann (Hemelaar, Gouws, Ghys, & Osmanov, 2006). Des Weiteren spielen rekombinante Formen in der Gruppe M eine große Rolle, die bei einer Super- oder Mehrfachinfektion eines Individuums mit unterschiedlichen Virussubtypen durch Genomaustausch entstehen. Diese rekombinanten Isolate können eine wichtige Rolle in der HIV-1 Pandemie spielen und werden dann als CRF (Circulating Recombinant Form) bezeichnet (Robertson et al., 2000). Bei dem zunächst als rein klassifizierten Subtyp E stellte sich heraus, dass sich nur die env-Region vom Subtyp A unterscheidet und das restliche Genom identisch ist, weshalb er heute als CRF01\_AE bezeichnet wird (Carr et al., 1996). Für den ebenfalls zunächst als rein klassifizierten Subtyp I wurde später herausgefunden, dass es sich um eine komplexe rekombinante Form verschiedener anderer Subtypen handelt und er erhielt den Namen CRF04\_cpx (Gao et al., 1998). Insgesamt wurden bisher mehr als 50 verschiedene CRF-Varianten beschrieben.

Die Häufigkeit und die geographische Verteilung der Subtypen und der CRFs sind sehr uneinheitlich. Weltweit ist mit 50% Subtyp C, der vor allem im südlichen Afrika, in Äthiopien und in Indien vorkommt, für die meisten Infektionen verantwortlich. Subtyp A ist mit 12% die zweit häufigste HIV-Variante und ist hauptsächlich in Zentralafrika, Westafrika, Ostafrika und Osteuropa verbreitet. An dritter Stelle kommt mit 10% Subtyp B, der die große Mehrzahl der HIV-Infektionen in Ländern der westlichen Welt verursacht. Subtyp G verursacht 6%, Subtyp D 3% und die Subtypen F, H, J und K

zusammen 1% aller HIV-Infektionen. Für die übrigen 18% der weltweiten HIV-Infektionen sind rekombinante Formen verantwortlich. Hierbei haben die Varianten CRF01\_AE und CRF02\_AB mit jeweils 5% die größte Bedeutung (Hemelaar et al., 2006). Die prozentualen Anteile der verschiedenen Subtypen und Rekombinanten an allen HIV-Infektionen weltweit sind in Tabelle 1.1 dargestellt.

Subtyp/ Rekominanten	Weltweites Vorkommen
Subtyp C	50%
Subtyp A	12%
Subtyp B	10%
Subtyp G	6%
Subtyp D	3%
Subtyp F, H, J, K	1%
CRF01_AE	5%
CRF02_AB	5%
Andere Rekombinanten	8%

**Tabelle 1.1:** Prozentualer Anteil der HIV-1 Subtypen und Rekombinanten weltweit (Daten nach Hemelaar et al., 2006).

Afrika ist unter allen Regionen diejenige mit der größten Vielfalt an zirkulierenden Subtypen und Rekombinanten. In Tansania sind von den reinen Subtypen die Varianten C (30 – 40%) und A (9 - 39%) die Häufigsten, gefolgt von Subtyp D (4 – 18%). Die CRFs haben in Tansania mit bis zu 50% einen ebenfalls großen Stellenwert. Die genauen prozentualen Anteile variieren je nach Studie (Herbinger et al., 2006; Njai et al., 2013; Nyombi, Kristiansen, Bjune, Müller, & Holm-Hansen, 2008).

Die große genetische Variabilität des HI-Virus ist neben den unterschiedlichen Subtypen und Rekombinanten auch durch das Vorliegen des Virus als Quasispezies erkennbar. Das bedeutet, dass innerhalb eines Wirts viele verschiedene, sehr ähnliche, aber genetisch nicht identische HI-Viren vorliegen, die durch Mutationen in dem Genom des

ursprünglich infizierenden Virus entstanden sind (Eigen, 1993). Diese während des Replikationszyklus immer wieder auftretenden Mutationen führen mit der Zeit zu veränderten Eigenschaften des Virus. Die Fähigkeiten des Virus, Mutationen und Rekombinationen zu vollziehen, und die zusätzlich sehr kurze Generationszeit führen zu einer hohen Evolutionsrate von HIV, was wiederum die Entwicklung erfolgreicher Impfstoffe erschwert (Jetzt et al., 2000).

Ob und wenn ja, welche Auswirkungen die genetischen Unterschiede auf die verschiedenen viralen Eigenschaften haben, wie z.B. das Auslösen von HAND (s. 1.2), ist noch unzureichend geklärt.

### **1.1.5 Antiretrovirale Therapie (ART)**

Für die Antiretrovirale Therapie der HIV-Infektion stehen mehr als 30 Präparate zur Verfügung, die nach ihrem Angriffspunkt im Replikationszyklus des HI-Virus (s. 1.1.2) sechs verschiedenen Wirkstoffklassen zugeordnet werden: Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTIs), Nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTIs), Protease-Inhibitoren (PIs), Fusionsinhibitoren, Corezeptorinhibitoren (CCR5-Antagonist) und Integrase-Inhibitoren (INIs). Die ART besteht in der Regel aus einer Kombination von drei Medikamenten dieser Wirkstoffklassen, wobei initial zwei NRTIs entweder mit einem NNRTI, PI oder INI kombiniert werden (DAIG, 2014).

Der optimale Zeitpunkt für den Therapiebeginn ist Gegenstand aktueller Forschung. Einig ist man sich, dass sowohl Patienten mit einer symptomatischen HIV-Infektion unabhängig von anderen Laborparametern, als auch asymptomatische Patienten mit einer CD4-T-Zellzahl  $<350/\mu\text{l}$  eine antiretrovirale Therapie erhalten sollten. Ob bei einer CD4-T-Zellzahl zwischen  $350-500/\mu\text{l}$  eine Behandlungsindikation gegeben ist, muss individuell, unter Berücksichtigung der Viruslast, der Dynamik der CD4-T-Zellzahl, des Alters des Patienten, dem Vorliegen von Koinfektionen sowie einer möglichen Schwangerschaft entschieden werden (Herold, 2013).

Therapieziel ist es, die Virusreplikation zu unterdrücken, dadurch die Viruslast unter die Nachweisgrenze zu senken sowie den Verlust der CD4-T-Zellen zu stoppen, was bei einem Großteil der HIV-Patienten auch gelingt (Gulick et al., 2003). Die Folge ist, dass

die Krankheitsprogression gebremst und HIV-assoziierte Symptome gelindert werden. Die HIV-Therapie ist eine lebenslange Therapie, da nach Absetzen der Medikamente die Viruslast wieder ansteigt und es zu einem Fortschreiten der Erkrankung kommt (Chun et al., 2000). Diese Beobachtung ist damit zu erklären, dass das Virus einige Zellen, insbesondere langlebige memory-T-Zellen und naive T-Zellen latent infiziert. Das bedeutet, es findet trotz Integration in das Wirtsgenom keine Replikation statt (s. 1.1.2). Da die HIV-Medikamente nur in den Replikationszyklus des Virus eingreifen, entziehen sich die Viren auf diese Art und Weise der Wirkung der Medikamente. Kommt es zu einer Reaktivierung dieses latenten Virusreservoirs, wird durch die Therapie eine Infektion neuer Zellen verhindert. Wurde die Therapie jedoch unterbrochen, führt die Reaktivierung zu einer Infektion weiterer Zellen und somit zu einem Anstieg der Viruslast mit der Folge der Krankheitsprogression. Latent infizierte Zellen stellen demnach ein sehr stabiles Virusreservoir dar, das auch unter lebenslanger Therapie bestehen bleibt (Finzi et al., 1999).

Ein weiteres Problem der HIV-Therapie ist die Entwicklung von Resistenzen gegen die Medikamente, was durch die hohe Evolutionsrate des Virus begünstigt wird (s. 1.1.4). Eine Resistenztestung sollte daher möglichst immer vor Therapiebeginn durchgeführt werden. Hierfür besteht jedoch vor allem in Entwicklungsländern nicht immer die Möglichkeit. Die Nebenwirkungen und Langzeittoxizitäten der Medikamente sind eine weitere Herausforderung der Therapie, da sie gravierend sein können und die Compliance des Patienten beeinflussen. Nicht zuletzt ist auch die Prophylaxe und Therapie der im Rahmen der AIDS-Erkrankung auftretenden opportunistischen Infektionen ein wichtiger Bestandteil der HIV-Therapie.

Wird die antiretrovirale Kombinationstherapie jedoch nach Resistenztestung regelmäßig und lebenslang eingenommen, ist von einer fast normalen Lebenserwartung auszugehen. Patienten mit einer initial hohen CD4-T-Zellzahl haben eine besonders günstige Prognose (The Antiretroviral Therapie Cohort Collaboration, 2008). Allerdings hat sich gezeigt, dass im Rahmen der HIV-Erkrankung auftretende neurokognitive Störungen nicht mit demselben Erfolg wie andere AIDS-definierende Erkrankungen von der Therapie beeinflussbar sind (Dore et al., 1999).

## **1.2 HIV-1 assoziierte neurokognitive Störung (HAND)**

HIV-1 assoziierte neurokognitive Störungen treten bei etwa der Hälfte aller HIV-Patienten im Verlauf der Erkrankung auf. Dabei können verschiedene Schweregrade beobachtet werden, die von geringen neurokognitiven Beeinträchtigungen, die den Alltag kaum beeinflussen, bis hin zur HIV-Demenz mit Pflegebedürftigkeit reichen können (s. 1.2.1). Seit der Einführung der antiretroviralen Therapie in den 90er Jahren ist die Inzidenz von HAND insgesamt zurückgegangen, wenn auch in geringerem Ausmaß als bei anderen AIDS definierenden Erkrankungen (Dore et al., 1999). Jedoch ist die Gesamtprävalenz auf Grund der verbesserten Lebenserwartung gestiegen (Sacktor et al., 2002). Insbesondere ist die Prävalenz von milden Formen von HAND angestiegen, während schwere Formen seltener als vor Einführung der Therapie beobachtet werden (Heaton et al., 2010; Heaton et al., 2011). Auch wenn schwere HIV-assoziierte Demenzen unter der antiretroviralen Therapie selten geworden sind, ist das Auftreten von HAND noch immer mit einem verkürzten Überleben assoziiert, weshalb der Forschung auf diesem Gebiet große Bedeutung zukommt (Vivithanaporn et al., 2010).

### **1.2.1 Klinik und Stadien von HAND**

Im Rahmen einer Erkrankung an HAND können verschiedene kognitive Domänen beeinträchtigt sein. Hierzu zählen die Sprache, Aufmerksamkeit, abstraktes Denken, Handlungsplanung, Merkfähigkeit, Geschwindigkeit der Informationsverarbeitung sowie motorische Fähigkeiten. Anhand des Schweregrades der Störungen wird HAND in drei Stadien eingeteilt: asymptomatische neurokognitive Beeinträchtigung (engl. asymptomatic neurocognitive impairment, ANI), milde neurokognitive Beeinträchtigung (engl. mild neurocognitive disorder, MND) und HIV-assoziierte Demenz (engl. HIV-associated dementia, HAD). ANI und MND sind dadurch definiert, dass die in neuropsychologischen Tests erzielten Ergebnisse in zwei kognitiven Domänen eine Standardabweichung unter der Norm liegen. Während MND mit leichten Schwierigkeiten in bestimmten Alltagsaktivitäten einhergeht, bleibt ANI asymptomatisch und macht sich im alltäglichen Leben nicht bemerkbar. Bei der HIV-Demenz (HAD) liegen in meist mehr als zwei kognitiven Domänen Beeinträchtigungen vor, die mindestens zwei

Standardabweichungen unter der Norm liegen. Diese Beeinträchtigungen führen dazu, dass der Alltag (Arbeit, Haushalt, soziale Aktivitäten) nicht mehr bewältigt werden kann und es zur Pflegebedürftigkeit kommt (Antinori et al., 2007).

Neben den Einschränkungen in den oben genannten kognitiven Domänen, ist häufig auch der psychopathologische Befund auffällig. In frühen Stadien sind oft eine Stimmungslabilität, Persönlichkeitsverflachung, Aspontanität und Ablenkbarkeit zu beobachten. In späteren Stadien liegen zusätzlich Zeitgitterstörungen und schließlich vollständige Desorientiertheit zu Zeit, Ort und Situation vor. Außerdem treten im Spätstadium neurologische und motorische Störungen wie Tremor, Bradykinese, Gang- und Haltungsstörungen sowie im Endstadium eine spastische Tetraplegie und Inkontinenz auf (C. Eggers & Rosenkranz, 2014).

### **1.2.2 Pathogenese und Risikofaktoren**

HIV-1 assoziierte neurokognitive Störungen entstehen durch eine Infektion des ZNS mit HIV. Schon im frühen Krankheitsverlauf überwindet das Virus mit Hilfe infizierter Makrophagen die Blut-Hirn-Schranke und gelangt in das Hirnparenchym. Dort repliziert das HI-Virus insbesondere in Mikrogliazellen. Da Neurone und Neurogliazellen durch HIV nicht infiziert werden, kommt es über indirekte Mechanismen zu einer Funktionsstörung und zum Zelltod von Neuronen und somit zur Entwicklung von HAND. Dies geschieht zum einen über neurotoxische HIV-Proteine (gp120, tat, vpu, vpr) und zum anderen über Entzündungsmediatoren, die jeweils von den infizierten Zellen sezerniert werden (Spudich & Gonzalez-Scarano, 2012). Die Entzündungsmediatoren rekrutieren und stimulieren weitere Immunzellen, die wiederum zusätzliche Entzündungsmediatoren freisetzen. Im Rahmen der Immunantwort kommt es so zu einer Akkumulation dieser Mediatoren (Zytokine, Chemokine, Proteasen), wobei insbesondere die Substanzen Chinolinsäure, Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-alpha), Plättchenaktivierender Faktor (PAF), Prostaglandine und Leukotriene eine Rolle in der Neurodegeneration spielen (Spudich & Gonzalez-Scarano, 2012). Diese zellulären und molekularen Mechanismen führen insgesamt zu einer erhöhten Immunaktivierung und chronischen Entzündung im ZNS. Wie auch in der Peripherie eine chronische Immunaktivierung ursächlich für das Fortschreiten der HIV-Erkrankung ist, so scheint

sie im ZNS ursächlich für die Entwicklung von HAND zu sein (Gannon, Khan, & Kolson, 2011; Jayadev & Garden, 2009; Spudich & Gonzalez-Scarano, 2012). Die Tatsache, dass HAND trotz der Einführung der antiretroviralen Therapie bestehen bleibt, ist möglicherweise mit der chronischen Immunaktivierung im ZNS zu erklären, die auch noch einige Jahre nach Beginn der Therapie nachweisbar ist, wohingegen sowohl die Plasma- als auch die Liquor-Viruslast zurückgehen (Edén et al., 2007).

Obwohl die genauen Mechanismen, die zu der Entstehung von HAND führen, noch in weiten Teilen unverstanden sind, konnten einige Risikofaktoren identifiziert werden. Das Risiko an HAND zu erkranken steigt durch die Einnahme von Drogen (z.B. Opiate, Kokain, Methamphetamin), höheres Alter des Patienten, Vorliegen von AIDS sowie durch chronisch erhöhte Parameter der Immunaktivierung (Gannon et al., 2011). Des Weiteren existieren genetische Prädispositionen für die Entwicklung von HAND, die mit erhöhten Plasmakonzentrationen von Monocyte-Chemoattractant-Protein-1 (MCP-1) und TNF-alpha einhergehen. Die Zytokine MCP-1, das zu den Chemokinen gehört, und TNF-alpha wirken proinflammatorisch, wodurch die Immunaktivierung und damit die Entstehung von HAND verstärkt werden. Es existiert jeweils ein genetischer Polymorphismus (s. 1.4) in der Promotorregion der beiden Gene, der mit einer erhöhten MCP-1- bzw. TNF-alpha-Produktion einhergeht und daher als Risikofaktor für die Entwicklung von HAND gilt (Jayadev & Garden, 2009). Ob es weitere genetische Prädispositionen für die Entstehung von HAND gibt, ist Gegenstand aktueller Forschungen. Auch die CD4-T-Zellzahl stellt ein Risikofaktor für HAND dar. Hier ist aber weniger die aktuelle CD4-T-Zellzahl ausschlaggebend, als vielmehr der CD4-T-Zell-Nadir, das heißt der im Verlauf der gesamten Erkrankung niedrigste Wert (Ellis et al., 2011).

Neben all diesen Wirtsfaktoren wurden auch virologische Faktoren auf ihren Einfluss auf die Entwicklung von HAND untersucht. Die Frage, ob bei einer Infektion mit einem bestimmten HIV-1 Subtyp häufiger HAND entsteht als bei anderen HIV-1 Subtypen, wurde in verschiedenen Studien untersucht und konnte noch nicht eindeutig beantwortet werden. Unterschiedliche Studien bringen zu diesem Thema verschiedene Ergebnisse hervor, nach denen einmal Subtyp D und einmal Subtyp A stärker mit neurokognitiven Einschränkungen korreliert (Boivin, Ruel, Boal, Bangirana, & Cao, 2010; Ned Sacktor et al., 2009).

Nicht zuletzt wird auch die antiretrovirale Therapie als möglicher Risikofaktor für die

Entstehung von HAND diskutiert. Es ist bekannt, dass die antiretroviralen Medikamente, vor allem NRTIs, neurotoxische Nebenwirkungen haben. Neben direkten neurotoxischen Wirkungen kann als Nebenwirkungen der HIV-Therapie auch ein metabolisches Syndrom mit abdomineller Adipositas, Insulinresistenz, Dyslipidämie und Bluthochdruck entstehen. Diese vaskulären Risikofaktoren können ebenfalls mit der Entstehung von neurokognitiven Beeinträchtigungen assoziiert sein. Es wird vermutet, dass die ART demnach sowohl direkte als auch indirekte Effekte auf die Entwicklung von HAND haben könnte (Gannon et al., 2011; Jayadev & Garden, 2009).

### **1.2.3 Diagnostik**

Auf Grund der hohen Gesamtprävalenz von HAND sollte jeder HIV-Patient auf das Vorliegen von neurokognitiven Beeinträchtigungen untersucht werden. Eine Wiederholung dieser Screening-Untersuchung alle 6-12 Monate bei Risikopatienten und alle 12-24 Monate bei Patienten ohne erhöhtes Risiko wird als sinnvoll erachtet (Mind Exchange Working Group, 2013).

Als Screening-Tests stehen verschiedene neuropsychologische Tests zur Verfügung, wobei immer fünf kognitive Domänen getestet werden sollten: Sprache, Aufmerksamkeit, abstraktes Denken bzw. Handlungsplanung, Merkfähigkeit, Geschwindigkeit der Informationsverarbeitung sowie motorische Fähigkeiten. Die verwendeten Tests sollten weiterhin an die Sprache und Kultur des Patienten angepasst und validiert sein. Eine Durchführung der Screening-Tests bei der gesunden Bevölkerung ist ebenfalls notwendig, da die Testergebnisse der HIV-Patienten an Hand der Abweichung von den Normergebnissen interpretiert werden (s. 1.2.1) (Mind Exchange Working Group, 2013).

Im Folgenden werden kurz die neuropsychologischen Tests genannt, deren Ergebnisse für die vorliegende Doktorarbeit verwendet werden. Zu den wichtigsten neuropsychologischen Tests gehört die Internationale HIV-Demenz Skala (IHDS). Dieser Screening-Test basiert auf der HIV-Demenz-Skala (HDS). Da die HDS stark von der kulturellen Prägung abhängig ist (sie setzt z.B. Lesefähigkeit voraus) wurde mit dem IHDS durch ein Weglassen von Sprach- und Rechenaufgaben ein kulturunabhängiger,

international einsetz- und vergleichbarer Test entwickelt (N. C. Sacktor et al., 2005). Die HDS detektiert insbesondere subkortikale Beeinträchtigungen, wie sie für HAND typisch sind. Die IHDS besteht aus drei Subtests, in denen die Merkfähigkeit (Memory-Recall), die motorische Geschwindigkeit (Motor-Speed) und die psychomotorische Geschwindigkeit (Psychomotor-Speed) überprüft werden. In allen drei Subtests können maximal 4 Punkte erreicht werden, so dass die Höchstpunktzahl der IHDS bei insgesamt 12 Punkten liegt (N. C. Sacktor et al., 2005).

Ein weiterer Test zur Feststellung kognitiver Defizite ist der Mini-Mental-Status-Test (MMS-Test). Dieser Test besteht aus vier Teilen. Im ersten Teil wird die Orientierung zur Ort und Zeit überprüft und es können maximal 10 Punkte erreicht werden. Der zweite Teil testet die Merk- und Erinnerungsfähigkeit (wie Memory-Recall bei der IHDS) mit maximal 6 Punkten und der dritte Teil die Aufmerksamkeit mit maximal 5 Punkten. Im vierten Teil des MMS-Tests werden Sprache, Sprachverständnis, Lesen, Schreiben und das Nachzeichnen von Figuren überprüft. Die hier maximal erreichbare Punktzahl beträgt 9, so dass die höchste Punktzahl des gesamten MMS-Tests bei 30 Punkten liegt (Folstein, Folstein, & McHugh, 1975). Der dritte Teil des MMS-Tests, der die Aufmerksamkeit entweder durch Rückwärtsbuchstabieren eines Wortes oder durch Rechnen überprüft, wurde in der HAND1-Studie auf Grund der im Durchschnitt geringen Schulbildung nicht durchgeführt. Die maximal erreichbare Punktzahl des MMS-Tests betrug daher nicht 30 Punkte, sondern 25 Punkte. Der MMS ist insbesondere zur Diagnose kortikaler Beeinträchtigungen entwickelt worden und detektiert subkortikale Beeinträchtigungen wie HAND mit geringerer Sensitivität (N. C. Sacktor et al., 2005).

Ein dritter neuropsychologischer Test ist der semantische Wortflüssigkeitstest (Verbal Fluency Test). Hierbei sollen die Probanden innerhalb einer Minute so viele Substantive wie möglich nennen, die zu einer bestimmten Kategorie von Wörtern gehören (z.B. Tiere im Fall der HAND1-Studie). Die Gesamtzahl der korrekt genannten Wörter stellt die erreichte Punktzahl dar. Es ist bekannt, dass die Leistung in diesem Test sowohl von dem Alter der Probanden als auch von der Schulbildung und der Volkszugehörigkeit abhängig ist (Gladsjo et al., 1999).

Der Digit Span Test ist ein neuropsychologischer Test, der die Aufmerksamkeit sowie das Arbeits- und Kurzzeitgedächtnis überprüft (Richardson, 2007). Die Aufgabe des Probanden ist es, eine immer länger werdende Nummernabfolge vorwärts (Digit Span

Test Forward) und rückwärts (Digit Span Test Backward) zu wiederholen. Die Punktzahl ergibt sich aus der Länge der längsten Nummernabfolge, die der Proband wiedergeben kann.

Ein Test zur Bestimmung der subjektiven Schläfrigkeit der Patienten ist die Pictorial Sleepiness Scale (PSS). Von fünf gezeichneten Gesichtern, die jeweils unterschiedliche Stadien von Müdigkeit darstellen, sollen die Probanden das Gesicht auswählen, das am ehesten ihrem eigenen Gemütszustand entspricht. Diese Cartoon-basierte Skala ist auch bei Probanden mit sehr niedrigem Bildungsstand oder bei Kindern gut anwendbar (Maldonado, Bentley, & Mitchell, 2004).

Im Rahmen der Diagnostik von HAND spielt der Ausschluss von möglichen Differenzialdiagnosen (z.B. andere Demenzformen, metabolische Enzephalopathie, ZNS-Infektionen mit anderen Erregern) eine wichtige Rolle. Hierfür sind diagnostische Maßnahmen wie bildgebende Verfahren und Elektroenzephalographie (EEG) notwendig.

#### **1.2.4 Therapie**

Für die Therapie von HAND wird die antiretrovirale Kombinationstherapie eingesetzt (s. 1.1.5). Um eine Suppression der Virusreplikation im ZNS zu erreichen, ist die Verwendung von Liquor-gängigen Substanzen notwendig. Hierunter kommt es zu einem raschen Abfall der Liquor-Viruslast und innerhalb einiger Monate zu einer Besserung der neurokognitiven Beschwerden (Eggers, van Lunzen, Buhk, & Stellbrink, 1999; Mind Exchange Working Group, 2013).

Jedoch scheinen die neurokognitiven Störungen weniger gut als andere AIDS-definierende Erkrankungen durch die ART behandelbar zu sein (Dore et al., 1999). Eine mögliche Ursache hierfür ist, dass die Entwicklung von HAND weniger durch die Viruslast als vielmehr durch die resultierende Immunaktivierung im ZNS, die trotz Therapie bestehen bleibt, beeinflusst wird (s. 1.2.2). Bleiben die neurokognitiven Beeinträchtigungen trotz ART bestehen, muss auch an die neurotoxischen Effekte der antiretroviralen Medikamente gedacht werden (s. 1.2.2) und gegebenenfalls auf alternative antiretrovirale Medikamente gewechselt werden (Mind Exchange Working Group, 2013). Bisher wurden auch einige andere, nicht antiretrovirale Medikamente auf

ihre Wirksamkeit bei HAND untersucht, bei denen sich jedoch noch keine klinisch relevanten Effekte ergaben. Insgesamt ist noch unzureichend verstanden, warum HAND durch die ART nicht in demselben Maße wie die anderen AIDS-definierenden Erkrankungen unterdrückt wird. Um eine wirksame Therapie gegen HAND entwickeln zu können, sind daher weitere Untersuchungen zur Pathogenese von HAND notwendig.

### **1.3 Immunaktivierung**

Im Rahmen einer Infektion mit einem pathogenen Erreger kommt es in dem infizierten Organismus im Regelfall zu einer Immunaktivierung und Entzündungsreaktion mit dem Ziel den Erreger zu eliminieren. Auch bei der HIV-Infektion kommt es zu einer Immunaktivierung, die jedoch das HI-Virus nicht aus dem Körper eliminieren kann, sondern die Infektion auf zellulärer Ebene sogar durchaus begünstigt. Dies ist damit zu erklären, dass das Virus bevorzugt aktivierte CD4-T-Zellen befällt, deren Anzahl im Rahmen der Immunaktivierung hochreguliert wird. Mittlerweile ist allgemein anerkannt, dass die chronische Immunaktivierung, die bei HIV-Patienten während des gesamten Krankheitsverlaufs nachweisbar ist, mit ursächlich für das Fortschreiten der HIV-Infektion bis in das AIDS-Stadium ist. Der Grad der Immunaktivierung stellt somit einen prognostischen Faktor für den Krankheitsfortschritt und die Mortalität dar (Ostrowski, 2010).

Nicht nur das Fortschreiten der HIV-Infektion in der Peripherie, sondern auch die Entwicklung von HAND, scheint mit der Höhe der Immunaktivierung assoziiert zu sein (s. 1.2.2) (Gannon et al., 2011).

Es existieren verschiedene Immunaktivierungsmarker, die unterschiedlich stark mit dem Krankheitsfortschritt der HIV-Infektion korrelieren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sind zwei Immunaktivierungsmarker von Bedeutung: soluble Urokinase Plasminogen Activating Receptor (suPAR) und humanes Lipopolysaccharid Bindungs-Protein (human LBP).

#### **1.3.1 Immunaktivierungsmarker suPAR**

Der Immunaktivierungsmarker suPAR ist die freie Form des membrangebundenen

Urokinase Plasminogen Aktivator Rezeptors (uPAR). Dieser Rezeptor ist per Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) an der Zellmembran verschiedener Zellen, vor allem an Immunzellen wie Makrophagen, aktivierten T-Zellen und neutrophilen Leukozyten, befestigt. Der Ligand des Rezeptors, die Urokinase (uPA), ist ein Enzym mit proteolytischer Aktivität, die bei Bindung an den Rezeptor weiter verstärkt wird. Eine wichtige Aufgabe von uPA ist die Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin und somit die Initiierung der Fibrinolyse. Der membrangebundene Rezeptor und sein Ligand uPA sind auch in Signalwege involviert, die für die Adhäsion, Migration, Proliferation und Differenzierung von Zellen verantwortlich sind. Hier spielt die proteolytische Aktivität von uPA keine Rolle (Ostrowski, 2010).

Es wurde nachgewiesen, dass bei einer Infektion mit HIV die Expression von uPAR hochreguliert ist und vor allem auch die Konzentration der löslichen Form des Rezeptors (suPAR) stark erhöht ist. Welche Funktion suPAR in vivo hat und was genau zu der erhöhten uPAR-Freisetzung von den Immunzellen führt, ist bisher noch nicht abschließend verstanden. Es wird angenommen, dass suPAR die Chemotaxis der Entzündungszellen und damit die Immunantwort vorantreibt (Thunø, Macho, & Eugen-Olsen, 2009).

Allgemein anerkannt ist aber, dass die suPAR-Konzentration mit einer erhöhten Immunaktivierung assoziiert ist und somit ein Prognosefaktor für das Voranschreiten der HIV-Erkrankung und das Mortalitätsrisiko darstellt. Allerdings muss beachtet werden, dass eine erhöhte suPAR-Konzentration keinesfalls spezifisch für eine HIV-Infektion ist, sondern auch bei anderen Erkrankungen mit systemischer Immunaktivierung (z.B. Malaria, Tuberkulose, ZNS-Infektionen, Sepsis, Pneumonie, verschiedene Malignome) nachweisbar ist (Ostrowski, 2010).

Der Immunaktivierungsmarker suPAR liegt in nahezu allen Körperflüssigkeiten (Blut, Plasma, Serum, Urin, Liquor) vor. Die Detektion der suPAR-Konzentration erfolgt meist aus dem Plasma der Patienten mit Hilfe des ELISA suPARnostic (s. 3.4.2).

### **1.3.2 Immunaktivierungsmarker human LBP**

Der Immunaktivierungsmarker human LBP gehört zu den Akute-Phase-Proteinen, die im Rahmen von Gewebsschädigungen durch Trauma oder Infektion als Teil der

unspezifischen Immunantwort gebildet werden. Bei einer Infektion mit gramnegativen Bakterien bindet LBP das in deren Zellwänden vorkommende LPS (Lipopolysaccharid). Daraufhin kann LPS mit dem CD14-Rezeptor, der vor allem auf Makrophagen exprimiert wird, interagieren, wodurch eine LPS-abhängige Monozytenreaktion als Teil der Immunantwort ausgelöst wird.

Im Rahmen einer HIV-Infektion spielt eine chronische Immunaktivierung eine wichtige Rolle für das Fortschreiten der Erkrankung (s. 1.1.2). Als eine Ursache der Immunaktivierung wird die Bakterien-Translokation im Gastrointestinaltrakt angesehen. Während der HIV-Infektion kommt es im Gastrointestinaltrakt früh zu einem Verlust der CD4-T-Zellen in der Mukosa sowie zu einer Zerstörung der epithelialen Barriere, wodurch eine Migration von Darmbakterienbestandteilen in das Pfortader-Blutsystem ermöglicht wird. Die Bakterienbestandteile, unter anderem das LPS, werden von dem Immunsystem im Blutkreislauf erkannt und lösen eine systemische Immunreaktion aus (s.o.). Es wird angenommen, dass die so entstehende Immunaktivierung mitverantwortlich für die Progression der HIV-Infektion ist (Klatt, Funderburg, & Brenchley, 2013).

Da die Bakterien-Translokation und die damit verbundene systemische Immunantwort mit einem vermehrten Auftreten von LPS assoziiert sind, steigt auch die Konzentration von LBP im Blut an und kann als Marker für den Grad der Immunaktivierung genutzt werden. Neben der Beobachtung, dass die LBP-Konzentration in Probanden, die AIDS haben, deutlich höher ist, als in gesunden Individuen, konnte in einer Studie gezeigt werden, dass auch ein Unterschied zwischen HIV-Patienten mit HIV-Demenz und HIV-Patienten ohne neurologische Auffälligkeiten besteht. Bei den Probanden, die eine HIV-Demenz aufwiesen, wurden deutlich höhere LBP-Konzentrationen gemessen, als bei den neurologisch unauffälligen Probanden (Ancuta et al., 2008).

#### **1.4 Genetische Polymorphismen**

Das Vorkommen von zwei oder mehreren unterschiedlichen Genvarianten in einer Population bezeichnet man als genetischen Polymorphismus. Die unterschiedlichen Genotypen beruhen auf DNA-Sequenzvariationen. Diese Sequenzvariationen können, wenn sie z.B. in der Promotorregion eines Gens liegen, auf den Genotyp beschränkt

bleiben und zu keinem veränderten Genprodukt führen. Liegt die Sequenzvariation innerhalb des codierenden Bereichs eines Gens kann jedoch ein verändertes Protein mit abweichender oder auch ohne Funktion exprimiert werden. Die Sequenzvariationen können verschiedene Ausmaße haben und reichen vom Austausch eines einzelnen Nukleotids (SNP = Single Nucleotide Polymorphism), über den Einbau oder Verlust von wenigen Nukleotiden (Insertions- und Deletionspolymorphismus) bis zur Vervielfachung oder Deletion ganzer Genabschnitte (Strukturvarianten).

Die genetische Ausstattung eines HIV-Patienten kann Auswirkungen auf den Verlauf der Infektion haben, was z.B. bereits für den Polymorphismus des Chemokinrezeptors CCR5 bewiesen wurde (Dean et al., 1996). Hierbei führt die Deletion von 32 Basenpaaren dazu, dass ein stark verändertes Protein gebildet wird, das nicht auf der Zelloberfläche exprimiert werden kann und somit nicht als Korezeptor für das HI-Virus zur Verfügung steht. Ist ein Mensch homozygot für diesen Polymorphismus, kann er nur schwer infiziert werden (Kayser et al., 2010).

Die Entwicklung von HAND kann ebenfalls durch das Vorliegen von bestimmten genetischen Polymorphismen begünstigt werden (s. 1.2.2). In diesem Zusammenhang kommt auch der Untersuchung des Polymorphismus des Dopamintransporters (DAT) und dessen Zusammenhang mit dem Auftreten von HAND Bedeutung zu.

#### **1.4.1 DAT-Polymorphismus**

Der Dopamintransporter ist in verschiedenen Bereichen des Gehirns lokalisiert, in denen Dopamin von den Neuronen freigesetzt wird. Hierzu zählen das Nigrostriatale-System, das Mesolimbische-System sowie das Mesocorticale-System. Das präsynaptisch freigesetzte Dopamin vermittelt über verschiedene postsynaptische Rezeptoren seine Wirkung. Die Beendigung der Wirkung erfolgt durch den DAT, der das Dopamin aus dem synaptischen Spalt wieder zurück in die Zelle transportiert. Das Gen, das für den Dopamintransporter codiert, ist auf dem Chromosom 5p15 lokalisiert. Es existieren verschiedene Polymorphismen, die sich durch die Anzahl der 40bp langen repetitiven DNA-Elemente (VNTR = variable number tandem repeats) am 3'-Ende des Gens unterscheiden. Diese können in 3 bis 11 Kopien vorliegen (Vandenbergh et al., 1992). Je nachdem welcher Polymorphismus vorliegt, unterscheidet sich die Menge des

exprimierten Proteins, nicht aber die Struktur. Die am häufigsten nachgewiesenen Polymorphismen 10/10 und 9/10 unterscheiden sich ebenfalls in der Menge des exprimierten Proteins. Während das 9/10 Allel mit einer niedrigeren DAT-Expression einhergeht, konnte für das 10/10 Allel eine höhere Expression des Transporters nachgewiesen werden (Fuke et al., 2001; Heinz et al., 2000).

Verschiedene Varianten des DAT-Polymorphismus konnten mit einigen psychiatrischen Krankheitsbildern wie Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung (ADHS), Bipolare Störungen, Depressionen und Alkoholismus in Verbindung gebracht werden (Greenwood et al., 2001; Laasonen-Balk, Kuikka, Viinamäki, Husso-Saastamoinen, M Lehtonen, & Tiihonen, 1999; Ueno et al., 1999; Yang et al., 2007).

Ob und wenn ja, welche Rolle der DAT-Polymorphismus in der HIV-Infektion oder in der Entwicklung von HAND spielt, ist noch nicht vollständig geklärt und Gegenstand aktueller Forschung. Es konnte gezeigt werden, dass in dem Gehirngewebe von HIV-Patienten mit HIV-Demenz nach dem Tod eine niedrigere Menge an DAT vorliegt als in Gehirngewebe von Probanden ohne HIV-Demenz (Wang et al., 2004). Ob ein bestimmter DAT-Polymorphismus mit einem erhöhten Auftreten von neurologischen Auffälligkeiten einhergeht, konnte bisher noch nicht gezeigt werden. Es wurde ebenfalls beobachtet, dass bei HIV-Patienten generell eine erhöhte Konzentration von Dopamin im Liquor nachweisbar ist als in gesunden Individuen. In diesem Zusammenhang stellte man im Rahmen einer Studie fest, dass das 10/10 Allel mit einer erhöhten Dopamin-Konzentration im Liquor einhergeht und bei HIV-Patienten signifikant häufiger auftritt als bei unifizierten Personen (Horn et al., 2013).

## **1.5 Zielsetzung**

Das Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss von verschiedenen virologischen und immunologischen Faktoren auf die Ausprägung von HAND bei HIV-Patienten aus Tansania zu untersuchen.

Der Verlauf der HIV-Infektion ist von Individuum zu Individuum unterschiedlich. Ebenso manifestieren sich die im Rahmen der HIV-Infektion vorkommenden neurologischen Störungen bei jedem HIV-Patienten in unterschiedlich starker Ausprägung. Es gibt neben Patienten, die im Krankheitsverlauf neurologisch vollständig unauffällig bleiben, auch

Patienten mit stärksten neurologischen Einschränkungen bis hin zur HIV-Demenz. Ursächlich für den individuellen Krankheitsverlauf sind zum einen virale Faktoren und zum anderen Wirtsfaktoren (Jayadev & Garden, 2009), deren Identifizierung für das bessere Verständnis der Pathogenese von HIV-assoziierten neurokognitiven Störungen bedeutend ist. Nicht zuletzt besteht die Hoffnung, durch die Identifizierung dieser Faktoren, neue und effizientere Therapiestrategien entwickeln zu können.

Im Einzelnen sollen drei unterschiedliche Faktoren auf ihren Zusammenhang mit HAND überprüft werden:

- 1) Ziel ist es, herauszufinden, ob zwischen dem virologischen Subtyp des HI-Virus und der Entwicklung von HAND eine Korrelation besteht. In zuvor durchgeführten Studien hatten sich unterschiedliche Zusammenhänge ergeben, nach denen einmal der HIV1-Subtyp D und einmal der HIV1-Subtyp A mit einer stärkeren neurokognitiven Einschränkung einher geht (Boivin, Ruel, Boal, Bangirana, & Cao, 2010; Sacktor et al., 2009). Zur Überprüfung dieser Beobachtungen soll der Subtyp des HI-Virus in HIV-Patienten aus Tansania bestimmt und mit den Ergebnissen von zuvor durchgeführten neuropsychologischen Tests in Beziehung gesetzt werden. Die Bestimmung des Subtyps soll dabei aus dem pol-Genabschnitt, der für die HIV-Protease codiert, erfolgen (s. 1.1.1).
- 2) Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss der Immunaktivierung in HIV-Patienten auf die Ausprägung von HAND zu untersuchen. Eine chronische Immunaktivierung wird als eine wesentliche Ursachen für das Fortschreitens der HIV-Infektion bis ins AIDS-Stadium sowie im ZNS für die Entstehung von HAND angesehen (Gannon et al., 2011; Ostrowski, 2010). In der vorliegenden Arbeit soll überprüft werden, ob zwischen den peripheren Konzentrationen zweier Immunaktivierungsmarker und HAND ein Zusammenhang besteht. Hierfür soll die Konzentrationen der Immunaktivierungsmarker suPAR und human LBP aus dem Plasma von HIV-Patienten aus Tansania bestimmt und mit den neuropsychologischen Testergebnissen verglichen werden.
- 3) Die Untersuchung der Zusammenhänge zwischen dem DAT-Polymorphismus bei

HIV-Patienten und dem Auftreten von HAND ist ebenfalls Ziel dieser Arbeit. Das Auftreten von HAND kann durch genetische Prädisposition begünstigt werden (Jayadev & Garden, 2009). Um herauszufinden, ob eine bestimmte Variante des DAT-Polymorphismus mit häufigerem Auftreten von HAND einhergeht, sollen diese Polymorphismen für die HIV-Patienten aus Tansania bestimmt und nach Korrelationen mit den Ergebnissen der neuropsychologischen Tests überprüft werden.

Da die Progression der HIV-Erkrankung mit einer chronischen Immunaktivierung korreliert (Kasang et al., 2012; Ostrowski, 2010), soll ferner auch untersucht werden, ob ein bestimmter HIV-Protease Subtyp mit einer höheren Immunaktivierung einher geht als die anderen Subtypen und somit bei einer Infektion mit diesem Subtyp eine schlechtere Prognose besteht.

## 2. Material

### 2.1. Geräte

Gerät	Hersteller, ggf. Modell
Agarosegel- Elektrophoresekammer	Institutswerkstatt
Agarosegel- Gießkammer	Institutswerkstatt
Autoklav 5075 ELC	Tuttnauer Systec
Einfrierbox	Nalgene
Eismaschine AF- 10	Scotsman
Elektrophoresedokumentationssystem Gel Doc 1000	Intas
ELISA-Reader Vmax kinetic microplate reader	Molecular Devices
Gefrierschränke	Bosch
Kühlschränke	Bosch
Laborwaage	Scaltec
Mikroliterpipette	Eppendorf, Gilson
Mikrowelle	Brother, Powerwave ER- 200
Multi- Kanal- Pipette 12fach	Costar
Nano-Drop Spektrometer (ND- 2000)	Thermo Scientific
Netzgerät: Computer controlled	
Elektrophoresis Power supply	Consort, Bio-Rad
Sterilwerkbank	Gelaire Flow Laboratories, BSB 4A
Thermoblock	Hartenstein TDB120
Thermocycler My Cycler iCycler iQ	Bio-Rad Bio-Rad
Tiefkühltruhen	Liebherr
Vortex- Gerät	Scientific Industries

Wasserbad	Memmert, Hartenstein
Zentrifugen	
Tischzentrifuge Mikro 200R	Hettich
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf
Tischzentrifuge Biofuge Pico	Heraeus

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Einmalhandschuhe Sensicare Ice	Medline
Glaserlenmeyerkolben	Schott
Glasflaschen	Schott
Glassmesszylinder (100ml, 250ml, 1000ml)	Schott
Glaspipetten (1ml, 2ml, 5ml, 10ml, 25ml)	Brand
Kryoröhrchen (2ml)	Hartenstein, Nalgene
Labor- Schutzbrille	Roth
Optische Folie, selbstklebend	Bio- Rad
Parafilm	Roth
PCR- Plastikreaktionsgefäß (200µl)	Hartenstein
PCR- Plastikreaktionsstrips 8er (200µl)	Hartenstein
PCR- Mikrotiterplatte 96 wells	peq lab
Pipettenspitzen, gestopft (1000µl, 200µl, 100µl, 10µl)	Biozym, Sorenson
Pipettenspitzen, ungestopft (1000µl, 200µl, 10µl)	Roth
Plastikreaktionsgefäße (1,5ml, 2ml)	Eppendorf, Sarstedt
Zellstofftücher	Kimberly- Clark

### 2.3 Chemikalien

Substanz	Hersteller
Agarose	Eurogentec
Destilliertes Wasser	
DNA- Ladepuffer (6x)	Fermentas
Ethanol 100%	Roth
Ethidiumbromid	
Gelred	
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	Fermentas
GeneRuler™ Ladder Mix	Fermentas
RNase freies Wasser	Quiagen

### 2.4 Enzyme

Enzym	Hersteller
Taq 2x MasterMix	New England Biolabs GmbH
Big dye Version 1.1	Applied Biosystems
One Step RT-PCR- Enzyme Mix	Quiagen

### 2.5 Reaktionskomplettausstattungen (Kits)

Kit	Katalognummer	Hersteller
ELISA Kit Human LBP	HK 315- 02	Hycult biotech
ELISA Kit suPARnostic	A 001	Viro Gates
Gene Elute™ PCR Clean- up Kit	NA 1020	Sigma Aldrich
Quiagen One Step RT-PCR Kit	210212	Quiagen
QIAamp DNA Mini Kit	51304	Quiagen
QIAamp Mini Elute Virus Spin Kit	57704	Quiagen

## 2.6 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Tris-Acetat Puffer 50x (TAE)	Tris pH 8,0 0,1 M EDTA 1,0 M Essigsäure
2%iges Agarosegel	3g Agarose 150 ml TAE- Lösung 40ml H <sub>2</sub> O 8µl Ethidiumbromid/ Gelred
Ladepuffer DNA 6x	2,5ml Bromphenolblau 3ml Glycerol 10ml ddH <sub>2</sub> O

## 2.7 Computersoftware und Internetseiten

Computerprogramme	Frima
Ape-A Plasmid Editor	M. Wayne Davis
Graphpad Prism 6.01	Graphpad
Microsoft Excel	Microsoft
Microsoft Word 2013	Microsoft

### Internetseiten

---

Clustal W2 ([http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web\\_clustalw2/toolform.ebi](http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web_clustalw2/toolform.ebi))

Stanford university database (<http://sierra2.stanford.edu/sierra/servlet/JSierra>)

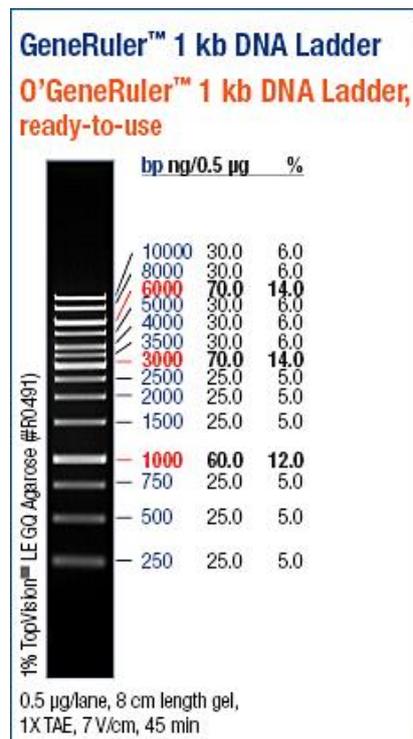
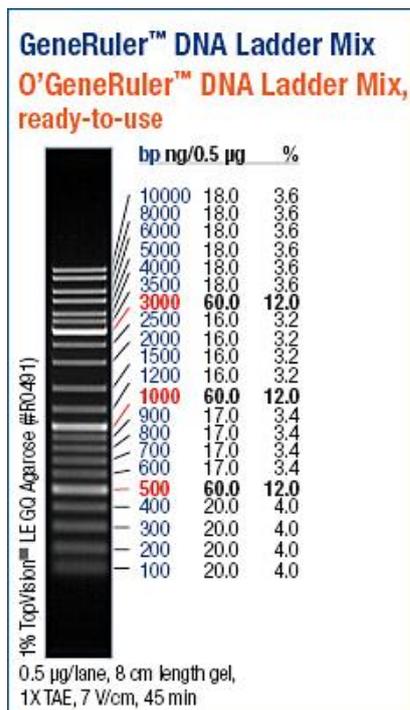
REGA HIV- 1 & 2 Automated Subtyping Tool (Version 2.0) (<http://www.bioafrica.net/rega-genotype/html/subtypinghiv.html>)

## 2.8 Längenstandards

Die verwendeten Nukleinsäurelängenstandards wurden von Thermo Fisher Scientific erworben.

Thermo Scientific™ GeneRuler™ DNA Ladder Mix

Thermo Scientific™ GeneRuler™ 1kb DNA Ladder



**Abbildung 2.1:** Verwendete Längenstandards für die Agarosegelelektrophorese. Links: Thermo scientific™ GenRuler™ DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific), rechts: Thermo scientific™ GenRuler™ 1kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)

## 2.9 Primer

Die verwendeten Primer wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen und in lyophilisierter Form geliefert. Die Lyophilisate wurden mit DEPC-behandeltem Wasser gemäß den Angaben des Datenblattes gelöst, so dass eine Endkonzentration von jeweils 100µM vorlag. Diese Lösungen wurden vor Gebrauch durch eine 1:10 Verdünnung mit

DEPC-Wasser auf eine 10µM Konzentration gebracht. Sowohl die Lösungen mit 100µM Konzentration als auch die mit 10µM Konzentration wurden bei -20°C im Gefrierschrank aufbewahrt.

#### Primer für den Polymorphismus DAT, VNTR

---

DAT VNTR Vandenberg fwd      5'- TGTAGGGAACGGCCTGAGAG – 3'  
DAT VNTR Vanderbergh rev      5'- CTTCTGGAGGTCACGGCTCAAAGG – 3'

Die Primer für den Genabschnitt, der für den Dopamin Transporter kodiert, wurden auf Grundlage einer Publikation über den DAT-Polymorphismus, in der die Lokalisierung dieses Genes auf dem Chromosom 5p15.3 beschrieben wird (Vandenberg et al., 1992), erstellt und verändert.

#### Primer für die Reverse Transkription

---

HIV-Pro fwd3                              5'- GGAAGGACACCAAATGAAAG – 3'  
HIV-Pro rev3                              5'- GGATTTTCAGGCCCAATT – 3'

#### Primer für die nested PCR

---

HIV-Pro fwd1                              5'- GAGCCAACAGCCCCACCAG – 3'  
HIV-Pro rev1                              5'- GGGCCATCCATTCCTGGC – 3'

#### Primer für die Sequenzierung

---

HIV-Pro fwd1                              5'- GAGCCAACAGCCCCACCAG – 3'

Die Primer für die Reverse Transkription, die nested PCR und die Sequenzierung wurden im Rahmen der HIV-Protease-Subtyp-Bestimmung verwendet. Ihre Bindungsstellen liegen alle auf dem HIV-Genom in Nachbarschaft zu dem Genabschnitt, der für die HIV-Protease codiert.

Die Primer wurden mit Hilfe von „Clustal W2“ und „Ape-A Plasmid Editor“ konstruiert. Ziel war es, diese Primer so zu erstellen, dass sie spezifisch an dem Genom aller HIV-Subtypen der Gruppe M des HIV-1 binden können. Bei der Konstruktion der Primer war zu beachten, dass die Primer etwa 20 Nukleotide lang sind, einen Guanodin-Cytosin-Gehalt von ~ 50% besitzen und die Nukleotide an den Enden Guanodin oder Cytosin als Base haben. Ihre Schmelztemperaturen sollten im gleichen Temperaturbereich liegen und sie sollten keine Interaktion mit sich selbst oder mit anderen Primern zeigen.

## **2.10 Blut- und Plasmaproben**

Die Vollblut- und Plasmaproben stammen aus der HAND1-Studie, im Rahmen derer 189 HIV-positive Patienten und 61 Kontrollpersonen im Bugando Medical Centre in Mwanza, Tansania auf die Prävalenz von HIV- assoziierten neurokognitiven Störungen untersucht wurden (s. 4.1).

Davon wurden Proben von 112 HIV-positiven Patienten und 30 Kontrollpersonen für die vorliegende Arbeit verwendet. Diese wurden bis zur Untersuchung bei –80 °C in Gefriertruhen des Instituts für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg aufbewahrt.

### **3. Methoden**

#### **3.1 Vorbereitung der Patienten-Proben**

Die Vollblut- und Plasmaproben enthielten 1 bis 2ml Blut bzw. EDTA-Plasma. Damit die Qualität der Proben durch wiederholtes Auftauen und Einfrieren nicht beeinträchtigt wird, wurden Aliquots der Größen 200µl und 50µl hergestellt. Diese wurden in Kryoröhrchen bei -80 °C gelagert.

Vor Verwendung der Proben wurden diese bei Raumtemperatur langsam aufgetaut und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gründlich gemischt.

Die Öffnung der Proben und die Weiterverarbeitung bis hin zu einem DNA- oder RNA-Isolat erfolgte ausschließlich in dem BSL-3 (*Biosafety Level 3*)-Labor des Instituts. Auch die Durchführung der ELISA fanden in diesem BSL-3-Labor statt.

#### **3.2 Bestimmung des DAT-Polymorphismus**

##### **3.2.1 Isolierung der Patienten- DNA**

In dem Gen für den Dopamin Transporter (DAT) gibt es verschiedenen Polymorphismen (s. 1.4.1). Um diese Polymorphismen bei den Patienten zu bestimmen, musste zunächst die Patienten-DNA aus den Vollblutproben isoliert werden.

Hierfür wurde das QIAamp DNA Mini Kit verwendet. Die Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien aus dem Kit erfolgte nach den Angaben in dem dazugehörigen Handbuch. Vorgegangen wurde nach dem Spin Protokoll unter Verwendung einer Tischzentrifuge.

Es wurden 20µl Quiagen Protease in ein 1,5ml Plastikreaktionsgefäß pipettiert. Dazu wurden 200µl der Patienten Probe sowie 200µl Puffer AL gegeben. Danach wurde für 15 Sekunden mit einem Vortexer gemischt, um eine homogene Suspension zu erhalten. Diese Suspension wurde für 10 Minuten bei 56°C in einem Wasserbad inkubiert, damit eine Lyse erfolgt, und anschließend kurz zentrifugiert, um Tropfen von der Innenseite des Deckels des Plastikreaktionsgefäßes zu entfernen. Nach der Zugabe von 200µl Ethanol

(100%), wurde erneut für 15 Sekunden mit einem Vortexer gemischt und danach kurz zentrifugiert.

Der Inhalt des Plastikreaktionsgefäßes wurde nun auf eine QIAamp Mini Spincolumn überführt, welche bei 6000 U/min für eine Minute zentrifugiert wurde. Während der Zentrifugation bindet die DNA aus den Patienten Proben an der Membran in der Spincolumn. Das Auffanggefäß wurde samt dem Filtrat verworfen und für den nächsten Schritt ein neues Auffanggefäß verwendet.

Nun folgten zwei Waschschriffe, bei denen verunreinigende Substanzen von der Membran entfernt werden, ohne die gebundene DNA zu schädigen. Es wurden jeweils 500µl Puffer AW1 (1. Waschschriff) bzw. Puffer AW2 (2. Waschschriff) auf die QIAamp Mini Spincolumn gegeben und anschließend bei 6000 U/min für eine Minute zentrifugiert. Für beide Waschschriffe wurden jeweils neue Auffanggefäße verwendet. Im Anschluss an den letzten Waschschriff wurde noch einmal für 3 Minuten bei 12000 U/min zentrifugiert.

Zu Letzt wurden 100µl Puffer AE auf die QIAamp Mini spin column gegeben, 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die an der Membran gebundene DNA durch 1 Minute Zentrifugation bei 6000 U/min eluiert.

Die isolierte DNA lag nun in Puffer AE vor und wurde bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

### **3.2.2 Photometrische Messung der DNA- Konzentration (NanoDrop)**

Die Bestimmung der Konzentration und der Reinheit der isolierten DNA erfolgte photometrisch mit einem NanoDrop®-ND-2000-Spektrophotometer.

Das Prinzip der Messung basiert auf dem Absorptionsmaximum der Purin- und Pyrimidinbasen bei einer Wellenlänge von 260nm und darauf, dass eine Absorptionseinheit  $A_{260}$  von 1,0 einer DNA-Konzentration von 50ng dsDNA/µl entspricht. Daraus folgt:

$$c \left[ \frac{\text{ng DNA}}{\mu\text{l}} \right] = A_{260} \times 50$$

Aus dem Verhältnis der Absortionswerte bei 260nm und bei 280nm erhält man außerdem

eine Aussage über eine mögliche Proteinkontamination in der Lösung. Ein Verhältnis von 1,8 spricht für eine reine DNA-Isolierung. Ist die Nukleinsäure-Lösung mit Proteinen oder Phenol kontaminiert, so ist der Wert signifikant kleiner. Absorptionsquotienten  $< 1,6$  kamen bei den Messungen nicht vor.

Die Nukleinsäuren zur Bestimmung des DAT-Polymorphismus lagen in Puffer AE vor. Bevor die Proben gemessen wurden, wurde das Photometer mit  $1\mu\text{l}$  AE-Puffer geeicht. Für die Messung der Proben wurde ebenfalls jeweils  $1\mu\text{l}$  der Lösungen eingesetzt.

Im Rahmen der Bestimmung des HIV-Protease Subtyps (s. 3.3) lagen die Nukleinsäuren in Elutions-Lösung (GeneElute PCR Clean-Up Kit, Sigma-Aldrich) vor. Auch hier wurde das Photometer zunächst mit  $1\mu\text{l}$  Elutions-Lösung geeicht, bevor die Messung der Proben stattfand.

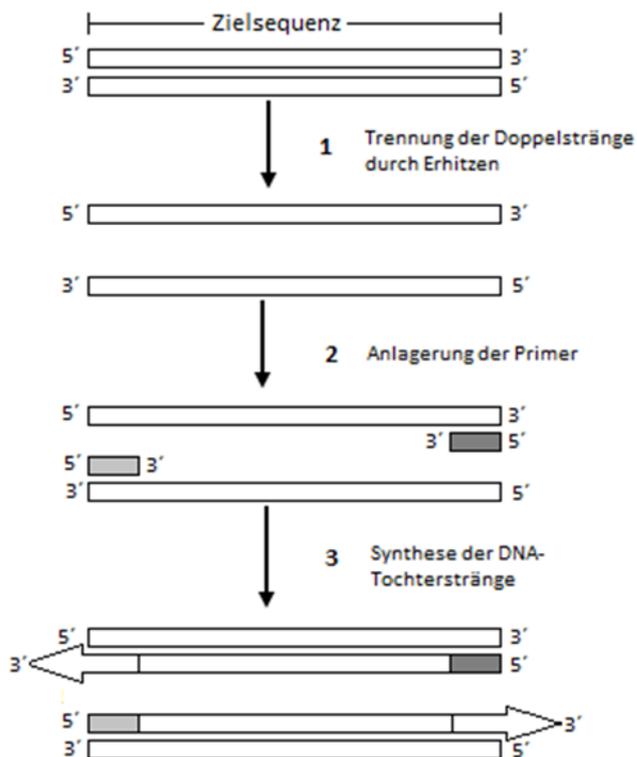
### **3.2.3 Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Der Abschnitt der Patienten-DNA auf Chromosom 5p15.3, der für den Dopamin Transporter codiert, wurde im nächsten Schritt mittels Polymerasekettenreaktion vervielfältigt.

Die Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) ermöglicht es, in vitro von geringsten Mengen an DNA genau definierte Gene bzw. Gen-Abschnitte exponentiell zu vervielfältigen.

Zu den nötigen Grundbestandteilen einer PCR gehören die DNA mit dem zu amplifizierenden Abschnitt („template“ oder „Matritzenstrang“) und zwei Primer (ca. 20 Basen lange, synthetisch hergestellte Oligonukleotide). Die Sequenzen der Primer sind so gewählt, dass sie jeweils an den beiden DNA-Einzelsträngen komplementär im Endbereich der Zielsequenz binden, wodurch der zu vervielfältigende Bereich von beiden Seiten eingegrenzt wird. Außerdem wird eine hitzestabile DNA-Polymerase (z.B. Taq-Polymerase) benötigt, die die ebenfalls erforderlichen Desoxynukleosidtriphosphate (dATP, dGTP, dCTP und dTTP) komplementär zur DNA an die Primermoleküle anfügt. So wird in  $5' \rightarrow 3'$  Richtung der neue Tochterstrang synthetisiert. Für ihre Funktion benötigt die DNA-Polymerase außerdem  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen und eine Pufferlösung, die eine

geeignete chemische Umgebung herstellt. All diese Komponenten werden in spezifischer Zusammensetzung (s. 2.2.4) in ein PCR-Reaktionsgefäß gegeben, welches in einen Thermocycler gestellt wird. Die PCR besteht aus 20-50 Zyklen, wobei jeder Zyklus in drei Schritte unterteilt wird (s. Abbildung 3.1).



**Abbildung 3.1:** Polymerasekettenreaktion (PCR): Ein Zyklus wird in 3 Schritte unterteilt: **1.** Trennung der DNA-Doppelstränge durch Denaturierung, **2.** Anlagerung der Primer an die DNA, **3.** Verlängerung der Primer durch DNA-Synthese (Abbildung nach Löffler et al., 2007)

Zunächst findet die Denaturierung der doppelsträngigen DNA statt, indem auf etwa 95°C erhitzt wird. Die hohe Temperatur führt dazu, dass die Wasserstoffbrücken-bindungen, die die beiden DNA-Einzelstränge verbinden, aufgebrochen werden. Im zweiten Schritt, dem Primer Annealing, lagern sich die Primer an die komplementären Sequenzen der DNA an. Die Temperatur hängt hierbei von den verwendeten Primern und ihrer Schmelztemperatur  $T_M$  ab, die sich annäherungsweise mit folgender Formel berechnen lässt:

$$T_M = [2 \times (A + T) + 4 \times (G + C)] \text{ } ^\circ\text{C}$$

Es werden also 2 Grad pro A/T-Nukleotid und je 4 Grad pro G/C-Nukleotid berechnet. Der dritte Schritt ist die Elongation, in dem die DNA-Polymerase die DNA-Töchterstränge synthetisiert. Die eingestellte Temperatur entspricht der Temperatur, in der die verwendete DNA-Polymerase ihr Arbeitsoptimum erreicht.

Die Produkte vorheriger Zyklen dienen als Ausgangsstoffe für den nächsten Zyklus, wodurch eine exponentielle Vervielfältigung des gewünschten DNA-Abschnittes stattfindet.

Zur Analyse bzw. zur Kontrolle des PCR-Produkts kann eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt werden (s. 3.2.5).

### 3.2.4 Durchführung der PCR zur Bestimmung des DAT-Polymorphismus

Für die Amplifikation des Genabschnittes, der für den Dopamin Transporter codiert, wurde ein 20µl PCR-Reaktionsansatz hergestellt. Als Matritzenstrang wurde 1µl der zuvor isolierten Patienten-DNA eingesetzt, was in etwa 20-50ng DNA entsprach.

Es wurde der Taq 2x MasterMix (BioLabs) verwendet, der neben der Taq-Polymerase die Desoxynukleosidtriphosphate (dATP, dGTP, dCTP und dTTP), Mg<sup>2+</sup>-Ionen und den Taq-Puffer enthält. Die Taq-Polymerase stammt aus dem thermophilen Bakterium „*Thermus aquaticus* YT-1“ und die vom Hersteller (BioLabs) empfohlene Elongations-Temperatur beträgt 68°C. Die Primer für den gesuchten Genabschnitt (s. 2.9) wurden in einer Konzentration von 10µM eingesetzt. Es ergab sich folgendes Pipettierschema:

10	µl	Taq 2x MasterMix (BioLabs)
0,5	µl	Primer DAT VNTR Vandenberg fwd (10µM)
0,5	µl	Primer DAT VNTR Vandenberg rev (10µM)
1	µl	DNA (20-50ng/µl)
8	µl	dH <sub>2</sub> O
<b>20</b>	<b>µl</b>	<b>Gesamtvolumen</b>

Die Reaktionsansätze wurden auf Eis in ein 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß pipettiert, wobei der Taq 2x MasterMix stets als Letztes dazu gegeben wurde. Vor der Amplifikation im Thermocycler (BioRad) wurde der Reaktionsansatz resuspendiert. Folgendes PCR-

Programm wurde eingestellt:

Schritt	Temperatur	Dauer	
1 Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	
2 Denaturierung	95 °C	15 sek	} 35 Zyklen
3 Primer Annealing	59,2°C	30 sek	
4 Elongation	68 °C	30 sek	
5 Finale Elongation	68 °C	5 min	

Die Schritte 2 bis 4 wurden 35-mal wiederholt. Um die PCR-Produkte zu analysieren, wurde im Anschluss eine Agarosegelelektrophorese (s. 3.2.5) durchgeführt.

### 3.2.5 Agarosegelelektrophorese

Das Verfahren der Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten in einem elektrischen Gleichstromfeld. Die wegen der Phosphatgruppen negativ geladene DNA wandert bei Anlegung einer Spannung von der Kathode zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist von der Größe der DNA-Moleküle abhängig, wobei kürzere DNA-Moleküle sich schneller bewegen als Längere. Zur Abschätzung der Größe der aufgetrennten Fragmente werden verschiedene Längenstandards eingesetzt (s. 2.8). Durch Zugabe eines Fluoreszenzfarbstoffes, der in die DNA-Doppelhelix interkaliert, können die Nukleinsäuren unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde bei der Bestimmung des DAT-Polymorphismus Ethidiumbromid verwendet, welches wegen seiner Toxizität während der Anfertigung der Doktorarbeit laborübergreifend durch Gelred ersetzt wurde. Für die Bestimmung des HIV-Protease-Subtyps (s. 3.3), die zu einem späteren Zeitpunkt erfolgte, wurde ausschließlich Gelred verwendet.

Welche Agarosekonzentration für das Gel gewählt wird, hängt von der Größe der zu trennenden Fragmente ab: je kleiner die Fragmente sind, desto höher sollte die Agarosekonzentration sein. In der vorliegenden Arbeit wurden die PCR-Produkte in einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt.

Zur Herstellung des 2%igen Agarosegels wurden 3g Agarose abgewogen und in 150ml 1× TAE-Puffer (s. 2.6) durch 4 Minuten langes Erwärmen in der Mikrowelle gelöst. Die verdampfte Flüssigkeitsmenge wurde durch ddH<sub>2</sub>O wieder aufgefüllt. Nach Abkühlung auf etwa 60°C wurden 8µl Ethidiumbromid bzw. Gelred hinzugegeben und durch vorsichtiges Schwenken in der Lösung verteilt. Anschließend wurde die Lösung in einen Plexiglasschlitten gegossen und ein Kamm zur Formung der Gelkammern eingebracht. Nach etwa 30 Minuten war das Gel ausgehärtet, so dass der Kamm entfernt und es in eine Gelkammer mit 1× TAE-Puffer gelegt werden konnte. Dann wurden die 1:6 mit 6fachem Ladepuffer (Thermo scientific) versetzten PCR-Produkte zu 10µl in die Taschen pipettiert. Von den verwendeten Längenmarkern (s. 2.8) wurden 6-10µl eingesetzt. Zur Auftrennung der DNA-Fragmente wurde eine Spannung von 80-120mV für 30 bis 90 Minuten angelegt. Die Lauffront konnte anhand des farbigen Ladepuffers gut verfolgt werden. Anschließend wurden die mit Ethidiumbromid bzw. Gelred markierten DNA-Banden in einer UV-Kammer (Gel Imager, INTAS) sichtbar gemacht und als digitales Bild abgespeichert.

Im Rahmen der Bestimmung des DAT-Polymorphismus wurde das PCR-Produkt durch eine Agarosegelelektrophorese nach der Größe aufgetrennt, so dass man auf Grund der Größe der einzelnen PCR-Produkte auf den vorliegenden Polymorphismus schließen konnte (s. 4.2).

Bei der Bestimmung des HIV-Protease-Subtyps (s. 3.3) wurde die Agarosegelelektrophorese zur Kontrolle genutzt, ob eine RNA-Isolation stattgefunden hat. Alle Proben mit einem sichtbaren DNA Fragment der erwarteten Länge von etwa 466 Nukleotiden wurden als PCR positiv gewertet und weiterverarbeitet.

### **3.3 Bestimmung des HIV-Protease Subtyps**

#### **3.3.1 Isolierung der HIV- RNA**

Für die Bestimmung des Subtyps der HIV-Protease bei den HIV-positiven Patienten, war es zunächst nötig, die RNA des Virus aus den EDTA-Plasmaproben zu isolieren.

Es wurde das QIAamp Mini Elute Virus Spin Kit verwendet. Das Prinzip ist ähnlich wie bei der DNA-Isolierung aus den Vollblutproben (s. 3.2.1) und besteht grob aus den

gleichen vier Schritten: 1. Lyse, 2. Binden der RNA an die Membran, 3. Waschen und 4. Eluierung. Die Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien aus dem Kit erfolgten auch hier nach den Angaben in dem dazugehörigen Handbuch.

Allerdings war zu beachten, dass RNA deutlich instabiler als DNA ist und schnell durch die sehr stabilen RNAsen abgebaut werden kann. Daher wurde versucht, das Risiko einer Kontamination mit RNAsen möglichst gering zu halten, indem sterile, RNase freie Einweg-Verbrauchsmaterialien (Pipettenspitzen, Plastikreaktionsgefäße) verwendet wurden. Auch auf das Wechseln der Einmalhandschuhen nach jedem Reaktionsschritt sowie die Nutzung der Mikroliterpipetten ausschließlich für RNA-Versuche wurde geachtet. Die Durchführung der RNA-Versuche fand stets unter einer Sterilwerkbank statt.

Im Einzelnen war das Vorgehen wie folgt: Es wurden 25µl Qiagen Protease in ein 1,5ml Plastikreaktionsgefäß pipettiert. Dazu wurden 200µl der Plasmaprobe gegeben sowie 200µl Puffer AL, der unter anderem carrier RNA enthält, die die RNA Gewinnung verbessern soll. Durch 15 Sekunden langes Mischen mit einem Vortexer, wurde eine homogene Lösung hergestellt, die dann für 15 Minuten bei 56°C in einem Wasserbad inkubiert wurde. Während dieser Zeit findet durch das Zusammenwirken der Qiagen Protease und des Puffer AL eine Lyse statt und auch eine Inaktivierung der gegebenenfalls vorliegenden RNAsen. Anschließend wurde kurz zentrifugiert, um Tropfen von der Innenseite des Deckels des Plastikreaktionsgefäßes zu entfernen. Nach Zugabe von 250µl Ethanol (100%), 15 Sekunden langem Mischen mit Hilfe eines Vortexers sowie 10 Minuten langer Inkubation bei Raumtemperatur, wurde die Lösung auf die QIAamp Mini Spincolumn übertragen. Es folgte eine Zentrifugation für 1 Minute bei 6000U/min, während der die RNA an der Membran der Spincolumn gebunden wird. Das Auffanggefäß mit dem Filtrat wurde verworfen und ein neues Auffanggefäß für den nächsten Schritt verwendet. In den folgenden drei Waschsritten werden verunreinigende Substanzen von der Membran entfernt, während die gebundene RNA nicht beschädigt wird. Zum Waschen wurden jeweils nacheinander 500µl Puffer AW1, Puffer AW2 sowie Ethanol (100%) auf die QIAamp Mini Spincolumn pipettiert und anschließend für 1 Minute bei 6000 U/min zentrifugiert. Für jeden dieser Schritte wurde ein neues Auffanggefäß verwendet. Nach dem letzten Waschschrift wurde noch einmal für 3 Minuten bei 1200 U/min zentrifugiert und für 3 Minuten mit offener Kappe bei 56°C

inkubiert, um die Membran vollständig zu trocknen. Für die Eluierung der gebundenen RNA wurde 50µl Puffer AVE auf die Membran gegeben und nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur bei 1200 U/min für 1 Minute zentrifugiert.

Die nun in Puffer AVE gelöste RNA wurde stets direkt im Anschluss durch eine Reverse-Transkriptase-Reaktion (s. 3.3.2) in DNA umgeschrieben.

### 3.3.2 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Um die Sequenz des HIV-Genoms genauer untersuchen zu können, muss die isolierte Virus-RNA zunächst in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben und dann vervielfältigt werden. Das wird durch die Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) erreicht, bei der zwei biochemischen Methoden, die Reverse Transkription (Umschreiben der RNA in cDNA) und die PCR (Vervielfältigung der cDNA), miteinander kombiniert werden.

Es wurde das QIAGEN OneStep RT-PCR Kit verwendet, welches einen Enzym Mix, einen spezifischen Reaktionspuffer, einen dNTP Mix sowie RNase freies Wasser enthält. Der QIAGEN OneStep RT-PCR Enzym Mix besteht zum einen aus zwei RNA abhängigen DNA-Polymerasen für die Reverse Transkription (Omniscript und Sensiscript Reverse Transkriptase) und zum anderen aus einer DNA-Polymerase, die DNA abhängig ist, für die anschließende PCR (HotStarTaq DNA Polymerase). Des Weiteren sind für die RT-PCR zwei Primer notwendig, die den zu amplifizierenden Genabschnitt eingrenzen. In diesem Fall lagen die Primer in Nachbarschaft zu dem Genabschnitt, der für die HIV-Protease codiert (s. 2.9). Als Matrizenstrang wurde die zuvor isolierte HIV-RNA eingesetzt. Auf eine photometrische Messung der RNA-Konzentration wurde verzichtet, da mit Verfälschungen durch die carrier RNA zu rechnen war. Für einen 50µl Ansatz ergab sich folgendes Pipettierschema:

10	µl	5× QIAGEN OneStep RT-PCR Puffer
2	µl	dNTP Mix
2	µl	QIAGEN OneStep RT-PCR Enzym Mix
3	µl	Primer HIV-Pro fwd3 (10µM)
3	µl	Primer HIV-Pro rev3 (10µM)

2	μl	RNA
28	μl	RNase freies H <sub>2</sub> O
<b>50</b>	<b>μl</b>	<b>Gesamtvolumen</b>

Die auf Eis in 0,2ml PCR-Reaktionsgefäße pipettierten Reaktionsansätze wurden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gründlich vermischt und zur Amplifikation in einen Thermocycler (BioRad) mit folgenden Einstellungen gestellt:

Schritt	Temperatur	Dauer	
1 Reverse Transkription	50 °C	30 min	
2 PCR Aktivierung	95 °C	15 min	
3 Denaturierung	94 °C	30 sek	} 30 Zyklen
4 Primer Annealing	52 °C	30 sek	
5 Elongation	72 °C	1 min	
6 Finale Elongation	72 °C	10 min	

Zunächst findet die Reverse Transkription statt, die durch Erhitzen für 15min auf 95°C beendet wird, da durch die hohe Temperatur eine Inaktivierung der Reversen Transkriptasen erfolgt. Durch das Erhitzen wird andererseits die HotStarTaq DNA-Polymerase aktiviert, so dass die PCR erst beginnen kann, nachdem die Reverse Transkription abgeschlossen ist. Nach Ablauf der PCR (s. 3.2.3) hat man den gewünschten Genabschnitt in Form von cDNA vielfach vorliegen.

### 3.3.3 Nested PCR

Um die Sensitivität und Spezifität zu erhöhen, wurde nach der RT-PCR noch eine nested PCR durchgeführt.

Hierbei dient das PCR-Produkt aus der RT-PCR als Matrize für die zweite PCR. Die Primer, die für diese zweite PCR verwendet werden, binden an Sequenzbereichen innerhalb der Matrize, das heißt innerhalb des ersten PCR-Produkts. Es resultiert ein zweites, kürzeres, hochspezifisches PCR-Produkt. Der Ablauf der PCR an sich

unterscheidet sich nicht von einer normalen PCR (s. 3.2.3). Mit Hilfe der nested PCR können auch kleine Mengen an DNA zuverlässig detektiert werden.

Für die vorliegende Arbeit wurde für die nested PCR der Taq 2x MasterMix (s. 3.2.4) verwendet. Das Pipettierschema für einen 50µl Reaktionsansatz sah wie folgt aus:

25	µl	Taq 2x MasterMix (BioLabs)
1	µl	Primer HIV-Pro fwd1 (10µM)
1	µl	Primer HIV-Pro rev1 (10µM)
1,5	µl	cDNA aus RT-PCR
21,5	µl	dH <sub>2</sub> O
<b>50</b>	<b>µl</b>	<b><i>Gesamtvolumen</i></b>

Am Thermocycler (BioRad) wurden für die Amplifikation folgende Einstellungen vorgenommen:

Schritt	Temperatur	Dauer	
1 Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	
2 Denaturierung	95 °C	20 sek	} 30 Zyklen
3 Primer Annealing	60 °C	30 sek	
4 Elongation	68 °C	41 sek	
5 Finale Elongation	68 °C	10 min	

Zur Kontrolle, ob eine RNA-Isolation stattgefunden hat, wurde im Anschluss an die nested PCR eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt (s. 3.2.5). War ein DNA-Fragment der erwarteten Länge von etwa 466 Nukleotiden sichtbar, wurde das PCR-Produkt aufgereinigt (s. 3.3.4) und sequenziert (s. 3.3.5).

### 3.3.4 Reinigung von PCR Produkten

Eine Aufreinigung wurde bei allen PCR-Produkten der nested PCR durchgeführt, bei denen in der Agarosegelelektrophorese eine Bande im erwarteten Längenbereich von

etwa 466 Nukleotiden nachweisbar war. Die Reinigung erfolgte mit dem GenElute™ PCR Clean-Up-Kit (Sigma-Aldrich) nach dem Herstellerprotokoll:

Zur Vorbereitung wurden 500µl Column Preparation Lösung auf die Säulen pipettiert und für 30 bis 60 Sekunden bei 1200 U/min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Zu einem Volumen PCR-Produkt (~ 40µl) wurden 5 Volumen Binding Solution (~ 200µl) pipettiert. Anschließend wurde das gesamte Volumen auf die vorbereitete Säule gegeben und 1 Minute bei 1200 U/min zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen, 500µl Waschlösung auf den Filter pipettiert und erneut für 1 Minute bei gleicher Umdrehungszahl zentrifugiert. Das Filtrat wurde wieder verworfen und um überschüssigen Waschpuffer zu entfernen erfolgte erneutes Zentrifugieren mit anschließendem Verwerfen des Durchflusses samt dem 2ml Auffanggefäß. Im nächsten Schritt wurde auf die Säulen, die ein neues Auffanggefäß erhielten, 50µl Elutions-Lösung pipettiert und anschließend nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wieder bei 1200 U/min für 1 Minute zentrifugiert. In dem so entstandenen Eluat befinden sich nun die gereinigten DNA-Fragmente.

1µl dieser Lösung wurde verwendet, um mit Hilfe einer photometrischen Messung die Konzentration der cDNA zu bestimmen (s. 3.2.2).

### **3.3.5 Sequenzierung**

Die aufgereinigten DNA-Fragmente enthalten den Genabschnitt, der für die HIV-Protease codiert. Um den Subtyp der HIV-Protease bestimmen zu können, müssen diese Fragmente sequenziert werden.

Die DNA-Sequenzierung ist eine Methode zur Bestimmung der Abfolge der Nukleotide in einem DNA-Molekül. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Sequenzierung der PCR-Produkte mit Hilfe des BigDye v1.1 (Applied Biosystems) nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger.

In einem PCR-ähnlichen Reaktionsansatz sind in einer Pufferlösung neben dem zu sequenzierenden DNA-Molekül, einem spezifischer Primer, einer Polymerase und den dNTPs auch ddNTPs (Di-Desoxyribonukleosidtriphosphate) enthalten. Jedes der vier verschiedenen ddNTPs ist mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert. Bei der

Elongation, baut die Polymerase zufällig dNTPs oder ddNTPs in den neuen Tochterstrang ein. Da den ddNTPs die 3'-Hydroxylgruppe für die Ausbildung der nächsten Phosphodiesterbindung fehlt, bricht bei Einbau dieser fluoreszierenden Nukleoside die PCR ab (Kettenabbruch-Reaktion), wodurch DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge entstehen. Im Unterschied zur PCR, wird bei der Sequenzierung nur ein Primer eingesetzt. Wird ein Primer aus der vorherigen PCR-Reaktion verwendet, entstehen dadurch DNA-Fragmente mit 3'-terminaler Fluoreszenzmarkierung der Längen des um ein Nukleotid verlängerten Primers bis hin zur Größe des PCR-Produktes. Zum Schluss hat man also eine Mischung aus allen unterschiedlich langen, fluoreszenzmarkierten DNA-Einzelsträngen, die mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt werden. Die vier mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierten ddNTPs werden durch Laserstrahlung angeregt und können so detektiert werden.

Die Sequenzierungs-Reaktionen wurden in 5µl-Ansätze durchgeführt. Ein Reaktionsansatz enthielt 1µl BidDye v1.1, 10ng DNA-Template, 1µl Primer HIV-Pro fwd1 aufgefüllt auf 5µl Gesamtvolumen mit dH<sub>2</sub>O.

Die Sequenzier-Reaktion erfolgte in einem Thermocycler (BioRad) mit den folgenden Einstellungen:

Schritt	Temperatur	Dauer	
1 Initiale Denaturierung	96 °C	1 min	
2 Denaturierung	96 °C	10 sek	} 25 Zyklen
3 Primer Annealing	50 °C	5 sek	
4 Elongation	60 °C	4 min	

Die ~500 Nukleotide langen Sequenzen wurden mit Hilfe der Stanford University Database in Hinblick auf den HIV-Subtyp analysiert.

### 3.4 Bestimmung der Immunaktivierung mittels ELISA

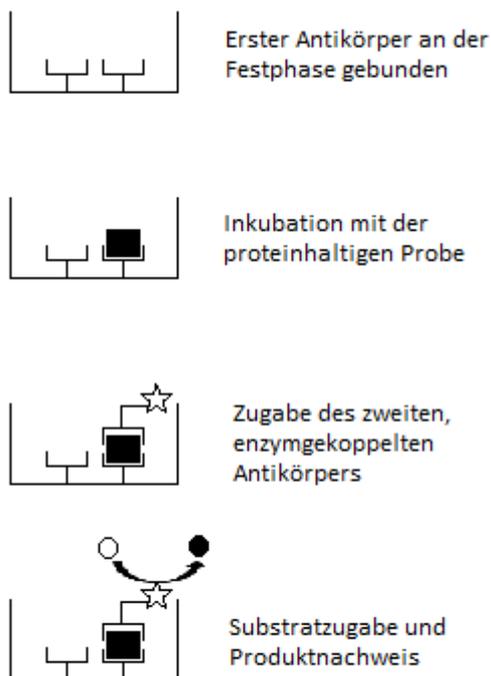
Um eine Aussage über den Grad der Immunaktivierung der Patienten machen zu können,

wurde die Höhe der Immunaktivierungsmarker suPAR und human LBP in dem Plasma der Probanden bestimmt. Das hierfür verwendete Verfahren war der ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

### 3.4.1 Prinzip des ELISA

Mit Hilfe eines ELISA kann man Proteine und andere niedermolekulare Verbindungen nachweisen und quantifizieren. Ein ELISA beruht darauf, dass Antikörper eingesetzt werden, die an einen spezifischen Stoff (in der vorliegenden Arbeit suPAR und human LBP) binden, was durch eine enzymatische Farbreaktion sichtbar wird und photometrisch gemessen werden kann. Im Folgenden wird das allgemeine Prinzip eines Sandwich-ELISA beschrieben (Abbildung 3.2).

Der Antikörper gegen das nachzuweisende Protein ist am Boden der Vertiefungen einer Mikrotiterplatte gebunden. Wird nun die zu untersuchende Substanz hinzugegeben,



**Abbildung 3.2:** Prinzip des ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay): für Einzelheiten s. Text (Abbildung nach Löffler et al., 2007)

bindet der Antikörper spezifisch dieses Protein. Danach wird ein weiterer gegen das Protein gerichteter Antikörper in die Vertiefungen gegeben, der ebenfalls das Protein bindet, jedoch an einem anderen Molekülabschnitt (Epitop) als der erste Antikörper, wodurch ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex (Sandwich) entsteht. An diesen zweiten Antikörper ist ein Enzym gekoppelt, das die spätere Farbreaktion katalysiert. Alternativ kann das Enzym auch an einen dritten Antikörper gekoppelt sein, der in einem weiteren Schritt hinzugegeben wird und spezifisch an den zweiten Antikörper bindet. Um überschüssige

enzymgekoppelte Antikörper zu entfernen, folgen meist mehrere Waschschriffe. Durch die Zugabe eines Substrats, welches durch das gekoppelte Enzym in ein farbiges Produkt umgesetzt wird, entsteht ein Farbumschlag, der je nach der Menge des nachzuweisenden Proteins unterschiedlich intensiv ausfällt. Nach dem Abstoppen der Farbreaktion kann die Absorption der Lösung mit einem Photometer bei entsprechender Wellenlänge gemessen werden, wobei die Absorption proportional zu der Konzentration des spezifischen Proteins ist. Um genaue quantitative Ergebnisse zu erhalten, ist es notwendig eine Standardreihe mit bekannter Proteinkonzentration durchzuführen. Aus diesen Ergebnissen kann eine Standardkurve berechnet werden, anhand derer die Konzentration des nachzuweisenden Proteins in den Plasmaproben ermittelt werden kann.

### **3.4.2 Bestimmung der suPAR Werte mittels ELISA**

Die Bestimmung der Konzentration von suPAR in den EDTA-Plasmaproben erfolgte unter Verwendung des ELISA-Kits suPARnostic nach dem Protokoll des Herstellers (Viro Gates). Bei diesem Sandwich-ELISA werden zuerst die zu bestimmenden Proben mit dem enzymgekoppelten Antikörper zusammen vermischt, bevor diese Lösung dann auf eine Antikörper-beschichtete Platte gegeben wird.

Die Vorbereitung des Waschpuffers sowie der Peroxidase-Konjugat-Lösung wurde gemäß den Angaben im dazugehörigen Handbuch durchgeführt. Die im Kit enthaltenen Standardlösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen (a: 22,5ng/μl, b: 16,9ng/μl, c: 11,3ng/μl, d: 5,6ng/μl, e: 1,1ng/μl) wurden durch 1:1 Verdünnung der Standards d (2,8ng/μl) und e (0,55ng/μl) sowie durch eine 1:2 Verdünnung des Standards e (0,275ng/μl) um drei Standardlösungen erweitert. Für die Verdünnung wurde Dilution-Puffer eingesetzt. Anschließend wurden zweimal 12,5μl der acht Standardlösungen sowie je 12,5μl der zu untersuchenden Plasmaproben und je zweimal 12,5μl einer Kontrolllösung und einer Blindprobe in die 96 Vertiefungen der weißen Mikrotiterplatte pipettiert. Die Standardlösungen, die Kontrolllösung und die Blindprobe wurden doppelt bestimmt. Im nächsten Schritt wurden in jede Vertiefung unter Verwendung einer Multi-Kanal-Pipette 112,5μl Peroxidase-Konjugat-Lösung, die Peroxidase gekoppelte anti-suPAR Antikörper enthält, dazu gegeben und durch viermaliges langsames Auf- und Abpipettieren vorsichtig gemischt. Mit der Multi-Kanal-Pipette wurden danach 100μl

Lösung aus jeder Vertiefung in die 96 Vertiefungen der durchsichtigen Mikrotiterplatte überführt, die mit anti-suPAR Antikörpern beschichtet ist. Die Platte wurde mit Folie abgeklebt und für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurden nach der Inkubation die Vertiefungen der Mikrotiterplatte fünfmal mit je 250µl Waschpuffer gewaschen. Im Anschluss an den letzten Waschschriff wurde die Platte auf Zellstofftüchern ausgeklopft bis keine Tropfen mehr zu sehen waren. Zur Detektion wurde nun in jede Vertiefung 100µl Substrat TMB (3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidin) pipettiert und es folgte eine Inkubation der mit Folie abgeklebten Platte für 20 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur. In den Vertiefungen, in denen suPAR enthalten war, wurde eine Blaufärbung sichtbar. Durch Zugabe von 100µl Stopp-Lösung in jede Vertiefung wurde die Reaktion gestoppt und die positiven Proben zeigten einen Farbumschlag nach gelb.

In einem ELISA-Reader (Molecular Devices) wurde die Absorption bei 450nm innerhalb von 30min nach Stoppen der Reaktion gemessen. Mit Hilfe der Software Graphpad Prism 6.01 konnte die Standardkurve berechnet werden, anhand derer die Konzentrationen von suPAR in den einzelnen Plasmaproben bestimmt wurden.

### **3.4.3 Bestimmung der human LBP Werte mittels ELISA**

Zur Bestimmung der Konzentration von human LBP in den EDTA-Plasmaproben wurde das ELISA-Kit Human LBP (Hycult biotech) verwendet. Es handelt sich um einen typischen Sandwich-ELISA (s. 2.2.4.1). Die Vorbereitung der Reagenzien und die Durchführung des ELISA erfolgten nach den Angaben des Herstellers.

Zunächst wurden die 96 Vertiefungen der Mikrotiterplatte viermal mit je 200µl Waschpuffer gewaschen, wobei darauf geachtet wurde, dass der Waschpuffer 20 Sekunden in den Vertiefungen einwirkt. Anschließend wurde die Platte zum Trocknen auf Zellstofftüchern ausgeklopft. Alle im Verlauf beschriebenen Waschschriffe erfolgten nach diesem Protokoll.

Der im Kit enthaltene lyophilisierte Standard wurde mit 0,5ml dH<sub>2</sub>O aufgefüllt, so dass man eine Konzentration von 300ng/ml erhielt. Von diesem Standard wurden weitere Verdünnungen mit Waschpuffer hergestellt, so dass insgesamt neun Standardlösungen vorlagen (50ng/ml, 33,3ng/ml, 22,2ng/ml, 14,8ng/ml, 9,9ng/ml, 6,6ng/ml, 4,4ng/ml,

2,2ng/ml, 1,1ng/ml). Von den so hergestellten Standards, die innerhalb einer Stunde verwendet werden mussten, sowie von einer Blindprobe wurden zweimal je 100µl in die Vertiefungen der mit human LBP- Antikörpern beschichteten Mikrotiterplatte pipettiert. Die Standardlösungen und die Blindprobe wurden doppelt bestimmt. Nach Herstellung einer 1000fachen Verdünnung der EDTA-Plasmaproben mit Waschpuffer wurden auch von diesen je 100µl in die Vertiefungen der Platte gegeben. Die so beladene Mikrotiterplatte wurde mit einer Folie abgeklebt und nach Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur folgte ein wie oben beschriebener Waschschrift.

Anschließend wurde mit Hilfe einer Multi-Kanal-Pipette in jede Vertiefung 100µl Detektions-Lösung, die anti-human LBP Antikörper enthält, gegeben und die abgeklebte Platte erneut bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden mit der Multi-Kanal-Pipette je 100µl Streptavidin-Peroxidase-Lösung, die Enzymgekoppelte Antikörper gegen die zuvor hinzugegebene Detektions-Antikörper enthält, in die Vertiefungen pipettiert. Es folgte wieder eine Stunde Inkubation und danach ein weiterer Waschschrift. Zur Detektion wurden nun je 100µl Substrat TMB eingesetzt und im Anschluss die Platte abgedeckt und für 30min im Dunkeln inkubiert. Man konnte eine Blaufärbung in allen Vertiefungen beobachten, in denen human LBP vorhanden war. Das Beenden der Reaktion durch Zugabe von 100µl Stopp-Lösung in jede Vertiefung, führte zu einem Farbumschlag von blau nach gelb.

Die Messung der Absorption in einem ELISA-Reader (Molecular Devices) erfolgte innerhalb von 30min nach Beendigung der Reaktion bei einer Wellenlänge von 450nm. Die Erstellung der Standardkurve sowie die Berechnung der Konzentrationen von human LBP in den Patientenproben wurde wie bei dem suPARnostic ELISA ebenfalls mit Hilfe der Software Graphpad Prism 6.01 durchgeführt (s. 3.4.2).

### **3.5 Statistik und graphische Darstellung der Ergebnisse**

Die statistische Auswertung sowie die graphische Darstellung von numerischen Ergebnisse erfolgte mit Graphpad Prism 6.01. Numerische Werte erhielt man zum einen aus den ELISA und zum anderen aus den Ergebnissen der neuropsychologischen Tests, die zur Untersuchung der Prävalenz von HIV- assoziierten neurokognitiven Störungen im Rahmen einer anderen medizinischen Doktorarbeit von Laura Kersting durchgeführt

wurden (s. 4.1). Diese numerischen Werte konnten verschiedenen Gruppen (z.B. Geschlecht, HIV-Protease Subtyp, Therapiestatus) zugeordnet werden. Zur Überprüfung, ob die Werte innerhalb einer Gruppe normalverteilt sind, wurde der *D'Agostino-Pearson omnibus normality Test* durchgeführt. Um die Gruppen untereinander zu vergleichen und mögliche Unterschiede festzustellen, waren weitere statistische Tests nötig. Lag eine Normalverteilung in den zu vergleichenden Gruppen vor, wurde bei zwei Gruppen der *t-Test* und bei mehr als zwei Gruppen der *One-way ANOVA Test* durchgeführt. Waren die Werte der Gruppen nicht normalverteilt, wurde bei zwei Gruppen der *Mann-Whitney U-Test* und bei mehr als zwei Gruppen der *H-Test nach Kruskal und Wallis* angewandt.

Wurden die numerischen Werte nicht verschiedenen Gruppen zugeordnet, sondern eine Korrelation mit anderen numerischen Werten untersucht, so wurde eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt. Hierfür wurde ebenfalls Graphpad Prism 6.01 genutzt. Bei einem p-Wert < 0,05 wurden die Ergebnisse als statistisch signifikant bezeichnet. Alle Mediane und Mittelwerte werden mit Standardabweichung angegeben.

Die graphische Darstellung von nicht numerischen Ergebnissen (z.B. HIV-Protease Subtyp, DAT-Polymorphismus) erfolgte mit Microsoft Excel.

Alle statistischen Auswertungen und graphischen Darstellungen der Ergebnisse wurden von der Autorin selbst erstellt.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1 Studien- und Patientenbeschreibung**

Die Blutproben, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit virologisch und immunologisch untersucht wurden, stammen aus der HAND1 Studie. Für diese Studie wurden im Frühjahr 2012 insgesamt 251 Patienten der Care and Treatment Clinic im Bugando Medical Center in Mwanza, Tansania, auf die Prävalenz von HIV-assoziierten neurokognitiven Störungen getestet. Die Studienteilnehmer wurden drei Gruppen zugeordnet: Gruppe 1: HIV-positive Patienten unter Antiretroviraler Therapie (ART) mit 101 Teilnehmern; Gruppe 2: HIV-positive Patienten ohne ART mit 88 Teilnehmern; Gruppe 3: HIV-negative Probanden (Kontrollgruppe) mit 61 Teilnehmern, die unmittelbar vor Studieneintritt im Rahmen einer Routine-HIV-Diagnostik negativ getestet wurden. Die Studienteilnehmer waren alle zwischen 18 und 60 Jahren alt und es war kein Drogen- oder Alkoholmissbrauch bekannt. Auch vorangegangene beziehungsweise aktuelle ZNS-Infektionen oder psychiatrische Erkrankungen lagen nicht vor.

Das Studiendesign sowie die Durchführung und Auswertung der in der HAND1 Studie eingesetzten neuropsychologischen Tests erfolgte im Rahmen der medizinischen Doktorarbeit von Laura Kersting (Kersting, 2015).

Für die vorliegende Arbeit wurden die Blutproben von 142 Teilnehmern dieser Studie untersucht. Davon gehören 75 in die Gruppe der HIV-Patienten mit ART und 37 in die Gruppe der HIV-Patienten ohne ART. Die übrigen 30 Proben bilden die Kontrollgruppe. Die Auswahl der Blutproben erfolgte zufällig. Die exakte Beschreibung des untersuchten Kollektivs enthält die folgende Tabelle.

	<i>HIV+ mit ART</i>	<i>HIV+ ohne ART</i>	<i>Kontrollgruppe</i>	<i>Gesamtes Kollektiv</i>
Anzahl (n)	75	37	30	142
Alter (Jahre)	40,4 ± 8,9	38,2 ± 8,6	30,0 ± 9,7	37,6 ± 9,8
Weiblich (%)	65,3	78,4	56,7	66,9
CD4-Wert (Anzahl/μl)	446,1 ± 260,1	550,9 ± 264,9		

**Tabelle 4.1:** Beschreibung des Patientenkollektivs mit Angabe von Alter und CD4-Wert (Mittelwert ± SD) zum Zeitpunkt der neuropsychologischen Untersuchung sowie des Geschlechterverhältnisses.

Der Frauenanteil ist mit insgesamt 66,9% hoch. Die Probanden der Kontrollgruppe sind im Mittel etwa 10 Jahre jünger als die HIV-positiven Studienteilnehmer.

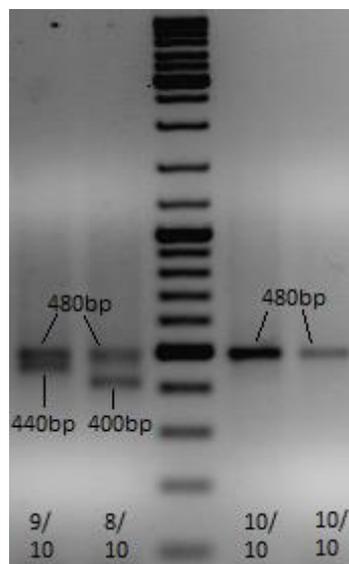
Die Ergebnisse der virologischen und immunologischen Untersuchungen der Blutproben (s. 4.2, 4.3, 4.4) wurden auch auf Zusammenhänge mit den Ergebnissen der neuropsychologischen Tests geprüft (s. 4.5, 4.6). Für diese Korrelationen standen die Testergebnisse, die von Laura Kersting in ihrer Doktorarbeit erzielt wurden, zur Verfügung. Im Einzelnen wurden die Resultate der folgenden neuropsychologischen Tests für die Korrelationen verwendet: Internationale HIV Demenz Skala (IHDS), Mini-Mental-Status-Test (MMS), Verbal Fluency Test, Digit Span Test, Pictorial Sleepiness Scale (PSS).

#### **4.2 Verteilung des genetischen Polymorphismus DAT in HIV-Patienten aus Tansania und in der Kontrollgruppe**

Für die Bestimmung des DAT-Polymorphismus wurde die DNA aus den Vollblutproben der 142 Probanden isoliert (s. 3.2.1) und anschließend eine PCR durchgeführt (s. 3.2.4). Das PCR-Produkt, das den Genabschnitt, der für den Dopamin Transporter codiert, enthält, wurde mittels Agarosegelelektrophorese (s. 3.2.5) aufgetrennt. Durch Vergleich der nach Auftrennung resultierenden Banden mit einem Längenstandard (Thermo scientific™ GenRuler™ DNA Ladder Mix) konnte der DAT-Polymorphismus, der bei dem jeweiligen Patienten vorliegt, bestimmt werden. Das am 3'-Ende des untersuchten Gens 40bp lange repetitive DNA-Element kann in 3 bis 11 Kopien vorliegen

(Vandenbergh et al., 1992). Je nach Länge der PCR-Banden, kann darauf geschlossen werden, wie viele Kopien des repetitiven DNA-Elements vorliegen und damit, welcher Polymorphismus vorliegt.

Bei einer 200bp langen Bande liegen 3 Kopien vor, bei 240bp 4 Kopien, bei 280bp 5 Kopien, bei 320bp 6 Kopien, bei 360bp 7 Kopien, bei 400bp 8 Kopien, bei 440bp 9 Kopien, bei 480bp 10 Kopien und bei 520bp 11 Kopien. Bei einer homozygoten Person sieht man nur eine Bande und bei einer heterozygoten Person zwei Banden mit unterschiedlicher Länge.

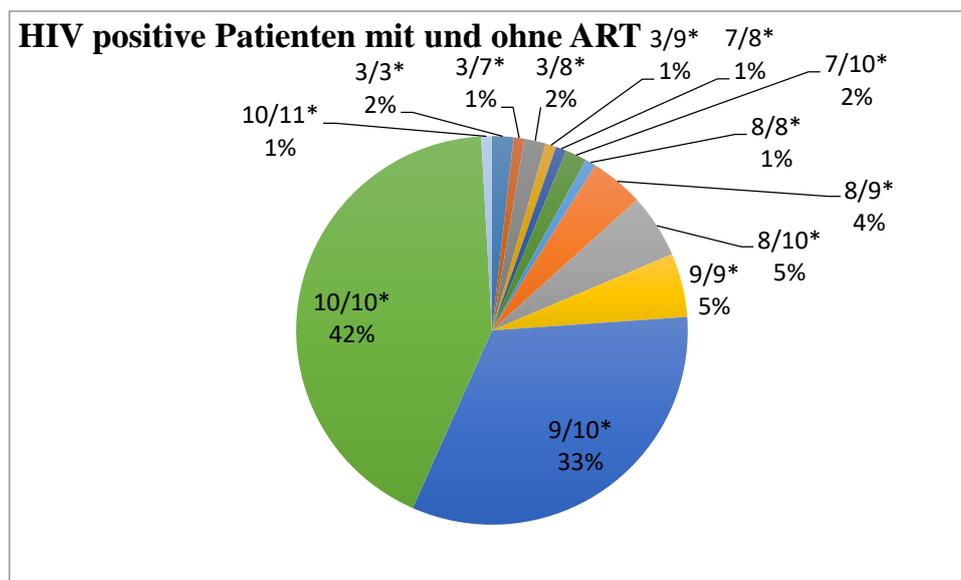


**Abbildung 4.1:** Auftrennung der PCR-Produkte auf einem 2%igen Agarosegel zur Bestimmung des DAT-Polymorphismus. Als Längenstandard wurde Thermo scientific™ GenRuler™ DNA Ladder Mix verwendet.

In Abbildung 4.1 sind beispielhaft vier aufgetrennte PCR-Produkte abgebildet. Die beiden Proben, die rechts des Längenstandards aufgetragen wurden, haben eine Länge von 480bp und sind somit homozygot für das 10-Repeat Allel. Die anderen zwei Proben weisen einen heterozygoten Polymorphismus auf mit jeweils einem 10-Repeat Allel und einem 8- bzw. 9-Repeat Allel. Auf diese Weise konnte für jeden der 142 Probanden der genetische Polymorphismus für das DAT-Gen bestimmt werden.

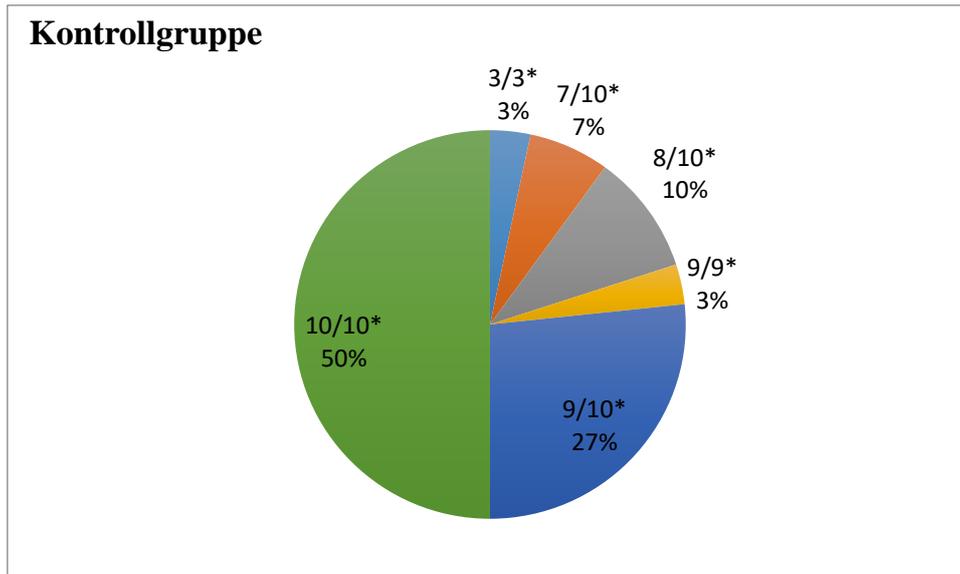
Die Verteilung des DAT- Polymorphismus wurde für die Gruppe der HIV-Patienten (mit

und ohne ART) sowie für die Kontrollgruppe graphisch dargestellt (Abbildung 4.2, 4.3). In den HIV-Patienten kommen die heterozygoten Allele 9/10 zu 33% vor und die homozygoten Allele 10/10 zu 42%. Neben diesen beiden Varianten, die mit insgesamt 75% den Großteil ausmachen, treten 11 weitere Genvarianten auf, die nur bei wenigen Patienten nachgewiesen wurden. Darunter sind die Allele 9/9 und 8/10 mit jeweils 5% sowie 8/9 mit 4% am häufigsten. Die Varianten 3/3, 3/8 und 7/10 machen jeweils 2% aus und die Varianten 3/7, 3/9, 7/8, 8/8 und 10/11 jeweils nur 1% (Abbildung 4.2).



**Abbildung 4.2:** DAT-Polymorphismus Verteilung in HIV-Patienten aus Tansania (mit und ohne ART, n = 112)

Bei der Kontrollgruppe sind die homozygoten Allele 10/10 mit 50% am häufigsten. Die heterozygote Variante 9/10 wurden mit 27% am zweit häufigsten nachgewiesen. Auch hier machen also diese beiden Genvarianten mit 77% die Mehrheit aus. In der Kontrollgruppe treten 4 weitere Varianten auf: 8/10 mit 10%, 7/10 mit 7% sowie 3/3 und 9/9 mit jeweils 3% (Abbildung 4.3).

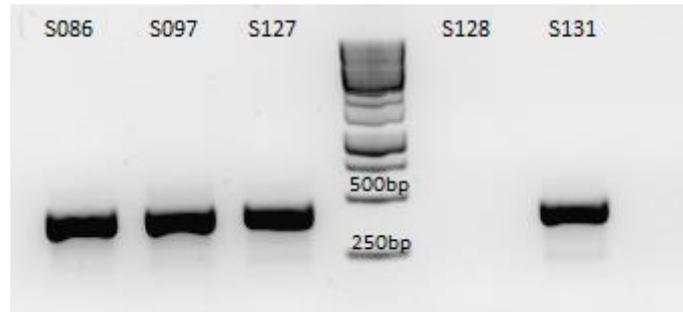


**Abbildung 4.3:** DAT-Polymorphismus Verteilung in nicht infizierten Kontrollpersonen aus Tansania (n = 30)

Im Vergleich der beiden Gruppen gibt es hinsichtlich der Verteilung der verschiedenen Polymorphismen keine signifikanten Unterschiede. Sowohl bei den HIV-positiven Probanden als auch bei den Kontrollpersonen dominieren bei dem DAT- Polymorphismus die Genvarianten 9/10 und 10/10. In der Gruppe der HIV-Patienten treten daneben 11 weitere Varianten auf, wo hingegen in der Kontrollgruppe nur 4 weitere Varianten nachgewiesen wurden.

#### 4.3 Verteilung der HIV-Protease Subtypen in HIV-Patienten aus Tansania

Die Bestimmung des HIV-Protease Subtyps erfolgte aus den EDTA-Plasmaproben der HIV-Patienten. Zunächst wurde die Virus-RNA isoliert (s. 3.3.1), die im nächsten Schritt in DNA umgeschrieben und vervielfältigt wurde (s. 3.3.2, 3.3.3). Die so entstandenen PCR-Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese (s. 3.2.5) aufgetrennt, um zu überprüfen ob die Virus-RNA-Isolation erfolgreich war (Abbildung 4.4).

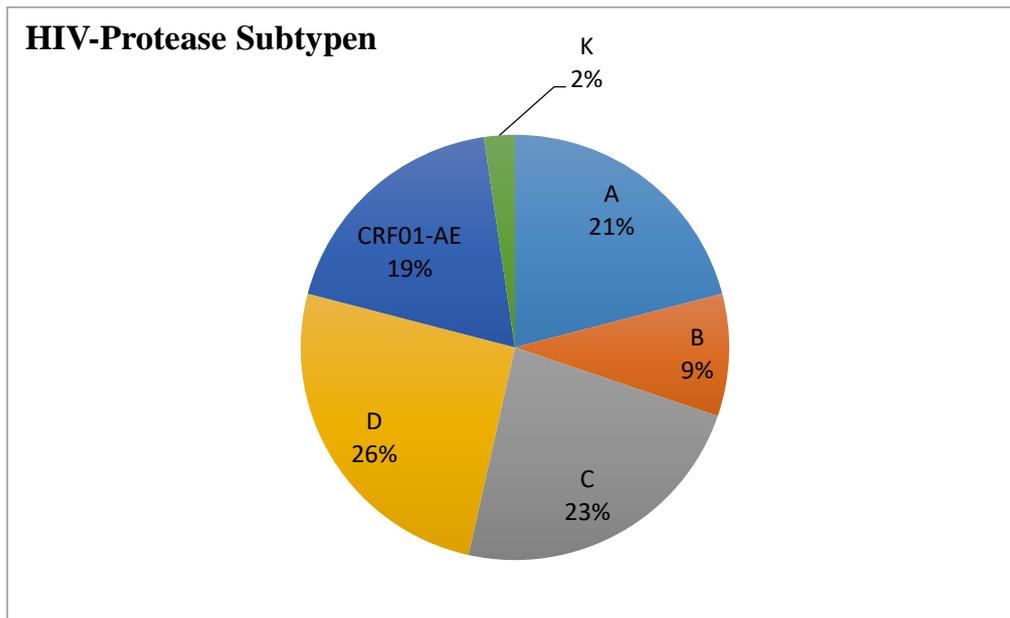


**Abbildung 4.4:** Auftrennung der PCR-Produkte auf einem 2%igen Agarosegel zum Nachweis der Virus-RNA-Isolation. Als Längenstandard wurde der Thermo scientific™ GenRuler™ 1kb DNA Ladder verwendet. Bei den Proben S086, S097, S127, S131 ist eine Bande im erwarteten Längenbereich von etwa 466bp sichtbar; hier war die RNA-Isolation erfolgreich. Die Probe S128 ist PCR-negativ; es hat keine RNA-Isolation stattgefunden.

Von den insgesamt 112 HIV-positiven Proben war bei 43 Proben (38,39%) eine Bande der erwarteten Länge von ca. 466 Basen nachweisbar und somit die RNA-Isolation gelungen. Bei dem Erfolg der Virus-RNA-Isolation besteht ein Unterschied zwischen der Gruppe der HIV-Patienten mit ART und der Gruppe der HIV-Patienten ohne ART. Bei den Patienten, die eine Therapie erhalten, gelang die Isolation nur bei 14 von 75 Proben (18,67%), wohingegen die Isolation bei den Patienten ohne Therapie bei 29 von 37 Proben (78,38%) erfolgreich war.

Die PCR-Produkte der 43 Proben, aus denen die RNA-Isolation gelungen war, wurden anschließend gereinigt (s. 3.3.4) und nach photometrischer Konzentrationsbestimmung (s. 3.2.2) sequenziert (s. 3.3.5). Die Analyse der Sequenzen in Hinblick auf den HIV-Protease Subtyp erfolgte mittels der Stanford University Database. Die Verteilung der HIV-Protease Subtypen in den HIV-Patienten aus Tansania ist in Abbildung 4.5 dargestellt.

Der HIV-Protease Subtyp D wurde mit 26% am Häufigsten nachgewiesen, gefolgt von Subtyp C mit 23% und Subtyp A mit 21%. Der rekombinante Subtyp CRF01-AE liegt in 19% der Fälle vor. Weiterhin treten bei 9% der Patienten der HIV-Protease Subtyp B und bei 2% der Subtyp K auf (Abbildung 4.5).



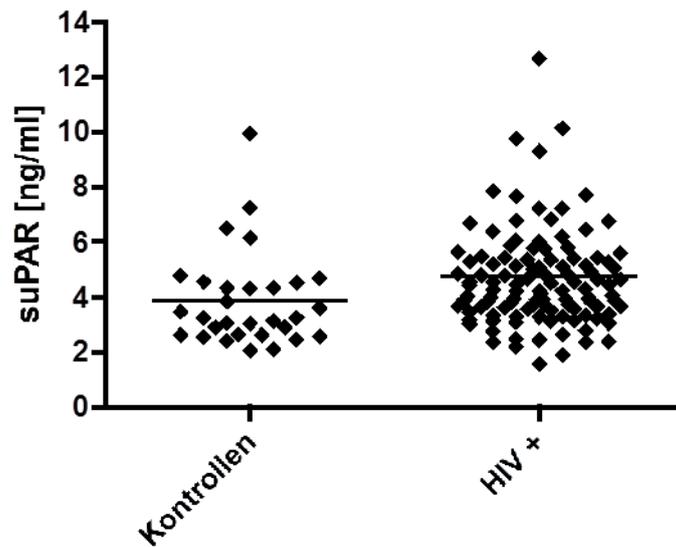
**Abbildung 4.5:** HIV-Protease Subtyp Verteilung in HIV-Patienten aus Tansania (mit und ohne ART, n = 43)

#### **4.4 Immunaktivierung in HIV-Patienten aus Tansania im Vergleich mit der Kontrollgruppe**

Um die Höhe der Immunaktivierung in den HIV-Patienten und in der Kontrollgruppe zu bestimmen, wurden die EDTA-Plasmaproben der 142 Probanden auf die Immunaktivierungsmarker suPAR und human LBP untersucht. Mittels zwei verschiedenen ELISA (s. 3.4.2, 3.4.3) konnten die Konzentrationen dieser Immunaktivierungsmarker festgestellt werden. Die statistische Auswertung und graphische Darstellung erfolgte mit Hilfe der Software Graphpad Prism 6.01.

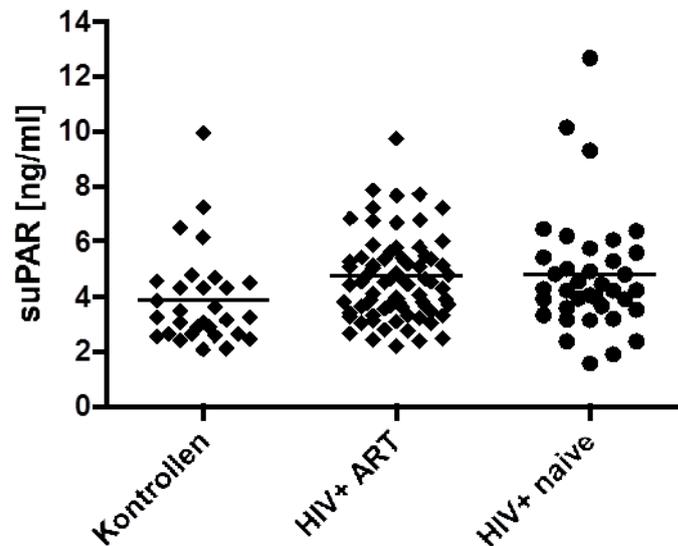
##### **4.4.1 Konzentrationen des Immunaktivierungsmarker suPAR in HIV-Patienten und in der Kontrollgruppe**

Die Konzentration des Immunaktivierungsmarkers suPAR ist in dem Plasma der Kontrollpersonen mit einem Mittelwert von  $3,9 \pm 1,7\text{ng/ml}$  signifikant ( $p = 0,0029$ ) niedriger als in dem Plasma der HIV-Patienten mit einem Mittelwert von  $4,7 \pm 2,0\text{ng/ml}$  (Abbildung 4.6).



**Abbildung 4.6:** Die Plasmakonzentration des Immunaktivierungsmarkers suPAR ist in der Kontrollgruppe (n=30) signifikant niedriger als in den HIV-Patienten (n=112);  $p = 0,0029$  (Mann-Whitney U-Test).

Unterteilt man die Gruppe der HIV-Patienten weiter in eine Gruppe mit ART und eine Gruppe ohne ART, stellt man fest, dass zwischen diesen beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied besteht (Abbildung 4.7). Die Therapie zeigt also keinen Einfluss auf die Konzentration des Immunaktivierungsmarkers suPAR in den HIV-Patienten. In der Gruppe mit Therapie liegt der Mittelwert bei  $4,7 \pm 1,9$ ng/ml und in der Gruppe ohne Therapie bei  $4,8 \pm 2,2$ ng/ml.

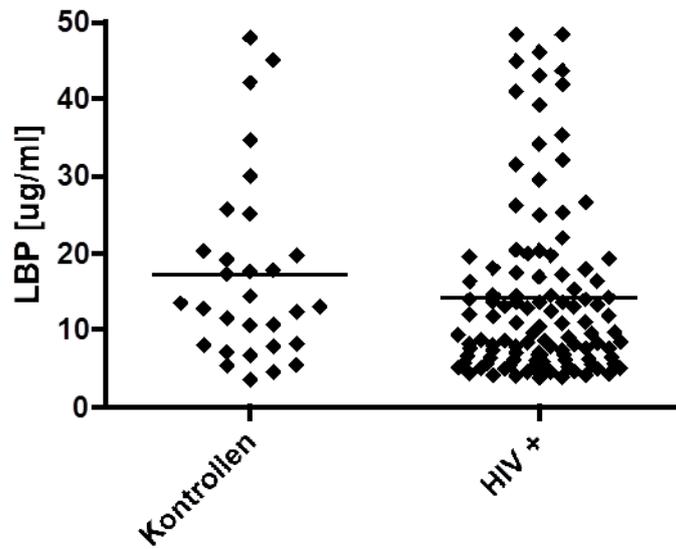


**Abbildung 4.7:** Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den suPAR-Konzentrationen der HIV positiven Gruppe mit ART (n=75) und ohne ART (n=37);  $p > 0,05$  (H-Test nach Kruskal und Wallis). Die suPAR-Konzentrationen im Plasma der Kontrollgruppe (n=30) sind signifikant niedriger als die Konzentrationen in beiden HIV positiven Gruppen, jeweils  $p < 0,05$  (H-Test nach Kruskal und Wallis).

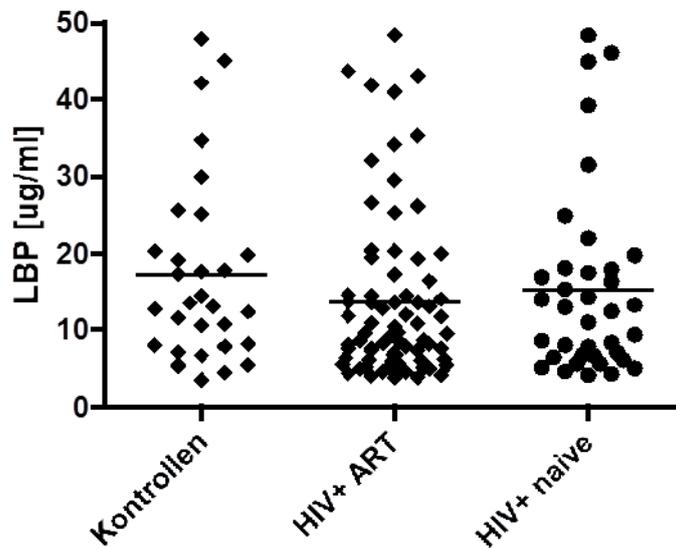
#### 4.4.2 Konzentrationen des Immunaktivierungsmarker human LBP in HIV-Patienten und in der Kontrollgruppe

Die Plasmakonzentration des Immunaktivierungsmarkers human LBP zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe der HIV-Patienten und der Kontrollgruppe (Abbildung 4.8). Der Mittelwert liegt in der HIV-positiven Gruppe bei  $14,3 \pm 11,4 \mu\text{g/ml}$  und in der Kontrollgruppe bei  $17,3 \pm 12,1 \mu\text{g/ml}$ . Es ist ein Trend zu sehen, dass in der Kontrollgruppe die Konzentrationen des Markers human LBP höher sind.

Bei der Unterteilung der HIV-Patienten in eine Gruppe mit ART und eine Gruppe ohne ART, zeigt sich auch hier kein signifikanter Unterschied (Abbildung 4.9). In der Gruppe mit ART liegt die Plasmakonzentration des Immunaktivierungsmarkers human LBP im Mittel bei  $13,7 \pm 11,0 \mu\text{g/ml}$  und in der Gruppe ohne ART bei  $15,4 \pm 12,2 \mu\text{g/ml}$ .



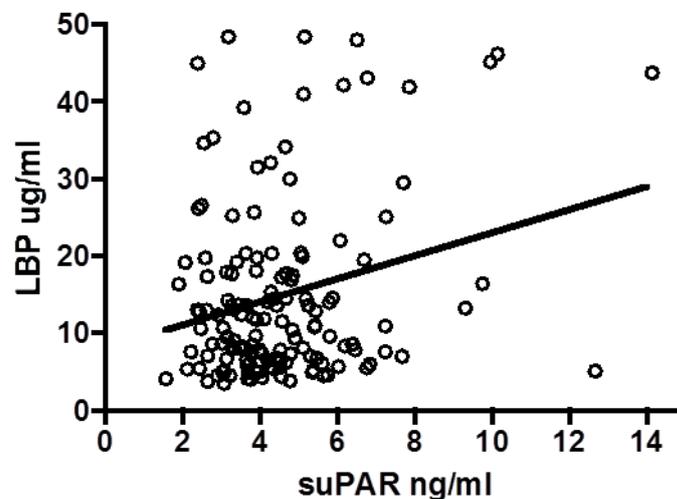
**Abbildung 4.8:** Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den human LBP-Konzentrationen der HIV positiven Patienten (n=112) und der Kontrollgruppe (n=30);  $p = 0,1104$  (Mann-Whitney U-Test).



**Abbildung 4.9:** Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den human LBP-Konzentrationen der HIV positiven Gruppe mit ART (n=75) und ohne ART (n=37) sowie der Kontrollgruppe (n=30); jeweils  $p > 0,05$  (H-Test nach Kruskal und Wallis).

#### 4.4.3 Korrelation zwischen den Konzentrationen der Immunaktivierungsmarkers suPAR und human LBP

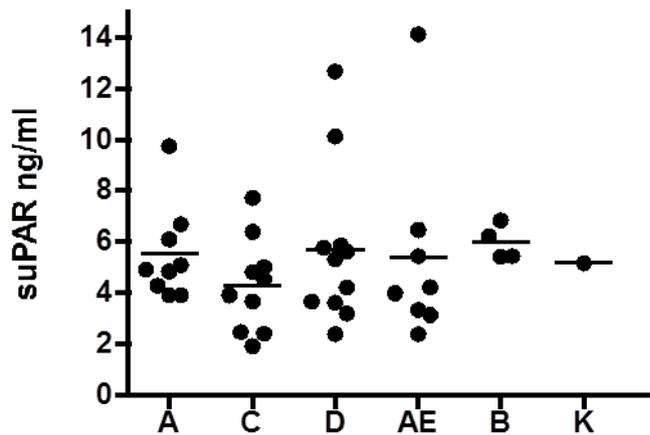
In der Untersuchung, ob es einen Zusammenhang zwischen der Höhe der Plasmakonzentration des Immunaktivierungsmarkers suPAR und der des Immunaktivierungsmarkers human LBP gibt, ergibt sich eine signifikant positive Korrelation (Abbildung 4.10). Umso höher die suPAR- Konzentration in dem Plasma eines Probanden ist, desto höher ist auch die human LBP-Konzentration.



**Abbildung 4.10:** Die Konzentrationen der Immunaktivierungsmarker suPAR und human LBP korrelieren signifikant positiv mit einander;  $p = 0,0026$ .

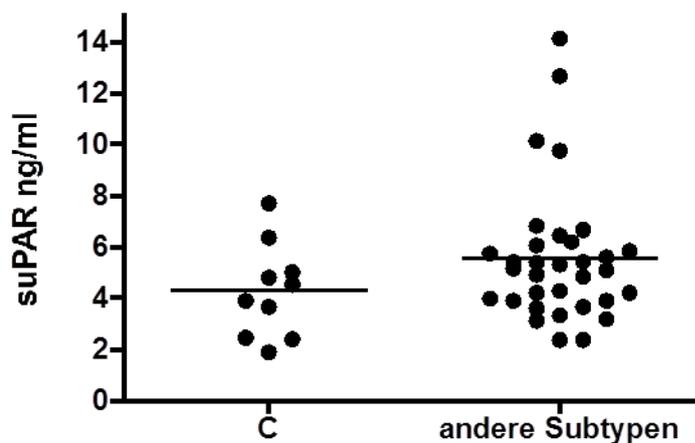
#### 4.5 Korrelationen zwischen den Subtypen der HIV-Protease und der Immunaktivierung

Es wurde untersucht, ob die unterschiedlichen Subtypen der HIV-Protease einen Einfluss auf die Höhe der Immunaktivierung haben. Hierfür wurden die suPAR- und human LBP-Plasmakonzentrationen der 43 HIV-Patienten, von denen der HIV-Protease Subtyp bestimmt werden konnte (s. 4.3), in Abhängigkeit von den jeweiligen Subtypen betrachtet. Die statistische Auswertung ergab, dass zwischen den suPAR-Konzentrationen, die bei den verschiedenen HIV-Protease Subtypen vorliegen, kein signifikanter Unterschied besteht (Abbildung 4.11).



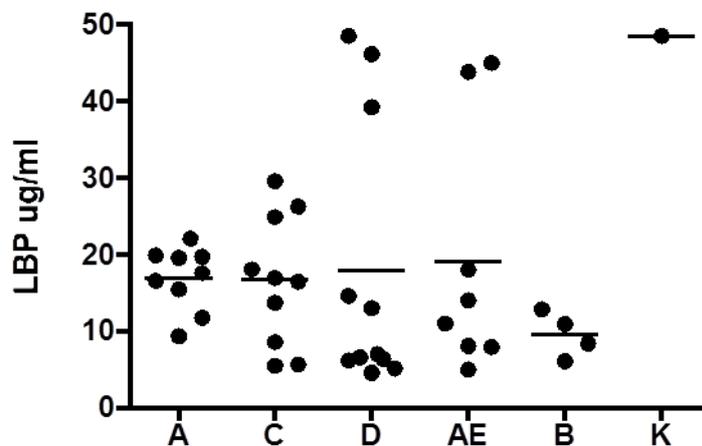
**Abbildung 4.11:** Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den suPAR-Konzentrationen bei den HIV-Protease Subtypen A (n=9), C (n=10), D (n=11), CRF01-AE (n=8), B (n=4) und K (n=1);  $p > 0,05$  (H-Test nach Kruskal und Wallis).

Es fällt auf, dass der Mittelwert der Plasmakonzentrationen des Immunaktivierungsmarkers suPAR bei dem HIV-Protease Subtyp C mit  $4,3 \pm 1,8\text{ng/ml}$  unter den Mittelwerten der anderen Subtypen A ( $5,5 \pm 1,9\text{ng/ml}$ ), D ( $5,7 \pm 3,1\text{ng/ml}$ ), CRF01-AE ( $5,4 \pm 3,8\text{ng/ml}$ ), B ( $6,0 \pm 0,7\text{ng/ml}$ ) und K ( $5,2 \pm 0\text{ng/ml}$ ) liegt. Trägt man die suPAR-Werte, die bei dem HIV-Protease Subtyp C vorliegen, gegen die Werte aller anderen Subtypen auf, kann man einen Trend sehen, dass bei Subtyp C die Konzentration des suPAR-Markers niedriger ist (Abbildung 4.12).



**Abbildung 4.12:** Es besteht keine Signifikanz, aber ein Trend, dass die suPAR-Konzentrationen bei dem HIV-Protease Subtyp C (n=10) unter denen der anderen Subtypen (n=33) liegen;  $p = 0,1427$  (Mann-Whitney U-Test).

Bei den Plasmakonzentrationen des Immunaktivierungsmarkers human LBP liegt ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen HIV-Protease Subtypen vor (Abbildung 4.13). Die Mittelwerte der human LBP-Konzentrationen liegen bei  $16,9 \pm 4,1 \mu\text{g/ml}$  für Subtyp A, bei  $16,6 \pm 8,5 \mu\text{g/ml}$  für Subtyp C, bei  $18,0 \pm 17,6 \mu\text{g/ml}$  für Subtyp D, bei  $19,1 \pm 16,1 \mu\text{g/ml}$  für Subtyp CRF01-AE und bei  $9,5 \pm 3,0 \mu\text{g/ml}$  für Subtyp B. Subtyp K wurde mit einer Konzentration von  $48,5 \pm 0 \mu\text{g/ml}$  in den statistischen Berechnungen auf Grund der geringen Anzahl ( $n=1$ ) nicht berücksichtigt.



**Abbildung 4.13:** Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den human LBP-Konzentrationen bei den HIV-Protease Subtypen A ( $n=9$ ), C ( $n=10$ ), D ( $n=11$ ), CRF01-AE ( $n=8$ ) und B ( $n=4$ ); jeweils  $p > 0,05$  (One-Way ANOVA Test).

#### 4.6 Korrelationen zwischen den Subtypen der HIV-Protease und den Ergebnissen der neuropsychologischen Tests

Es wurde geprüft, ob die Ergebnisse der neuropsychologischen Tests von den unterschiedlichen Subtypen der HIV-Protease beeinflusst werden. Für diesen Zweck wurden die Testergebnisse der 43 HIV-positiven Probanden, bei denen die Virus-RNA-Isolation gelungen war, dem jeweiligen Subtyp zugeordnet. Die statistische Analyse ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Testergebnissen bei den unterschiedlichen HIV-Protease Subtypen (Tabelle 4.2).

Um die in der Tabelle 4.2 angegebenen Mediane einordnen zu können, ist es notwendig die maximal erreichbaren Punktzahlen der jeweiligen Tests zu kennen (s. auch 1.2.3). Bei der Internationalen HIV Demenz Skala (IHDS) können maximal 12 Punkte erreicht



Test	A (n = 9)	C (n = 10)	D (n = 11)	AE (n = 8)	B (n = 4)	K (n = 1)
IHDS <sup>1</sup>	8,0 ± 1,8	9,0 ± 1,3	9,0 ± 1,4	7,5 ± 1,4	8,5 ± 0,6	10,0 ± 0
IHDS motorspeed <sup>2</sup>	1,0 ± 0,4	1,0 ± 0,4	1,0 ± 0,7	1,0 ± 0,4	1,0 ± 0,5	1,0 ± 0
IHDS psychomotorspeed <sup>2</sup>	3,0 ± 0,8	4,0 ± 1,1	4,0 ± 0,9	3,5 ± 1,0	3,5 ± 0,6	2,0 ± 0
IHDS memoryrecall <sup>2</sup>	4,0 ± 1,1	4,0 ± 0,3	4,0 ± 0,7	3,0 ± 0,5	4,0 ± 0,5	3,0 ± 0
MMS <sup>2</sup>	23,5 ± 1,0	24,0 ± 0,4	24,0 ± 0,5	24,5 ± 0,3	24,25 ± 0,7	23,0 ± 0
MMS Orientierung <sup>2</sup>	10,0 ± 1,0	10,0 ± 0,3	10,0 ± 0,4	10,0 ± 0,4	10,0 ± 0	10,0 ± 0
MMS Merkfähigkeit <sup>2</sup>	6,0 ± 0,3	6,0 ± 0	6,0 ± 0,2	6,0 ± 0	6,0 ± 0	6,0 ± 0
MMS Sprachverständnis <sup>2</sup>	7,5 ± 1,4	8,0 ± 1,2	8,0 ± 1,2	8,75 ± 0,9	8,25 ± 1,4	7,0 ± 0
Verbal Fluency Test <sup>1</sup>	10,0 ± 2,1	11,0 ± 4,1	9,0 ± 2,3	11,5 ± 3,5	10,5 ± 3,6	11,0 ± 0
Digit Span Test <sup>1</sup>	9,0 ± 2,5	8,5 ± 3,7	9,0 ± 2,1	10,5 ± 3,1	8,5 ± 1,0	8,0 ± 0
Pictorial Sleepiness Scale <sup>1</sup>	2,0 ± 1,6	1,5 ± 0,8	2,5 ± 1,5	2,5 ± 1,6	2,5 ± 1,7	1,0 ± 0

**Tabelle 4.2:** Ergebnisse der Neuropsychologischen Tests in Abhängigkeit von dem Subtyp der HIV-Protease. Angaben als Median ± SD. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Testergebnissen bei den verschiedenen HIV-Protease Subtypen; jeweils  $p > 0,05$  (<sup>1</sup>One-Way ANOVA Test, <sup>2</sup>H-Test nach Kruskal und Wallis). Allerdings schneiden bei einer gemeinsamen Analyse von Subtyp A und CRF01-AE versus restliche Subtypen die A-anteiligen Subtypen mit einem statistisch signifikant schlechterem IHDS-score ab ( $p = 0,0203$ ; t-Test; Abbildung 4.14).

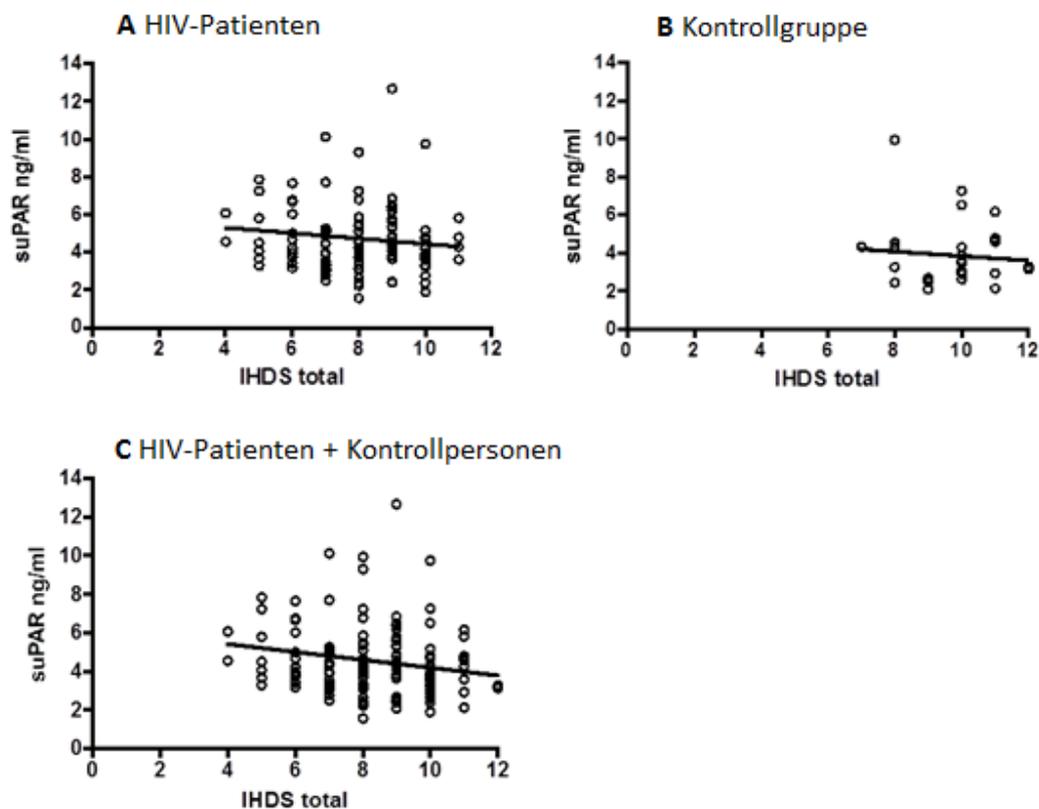
## **4.7 Korrelationen zwischen der Immunaktivierung und den Ergebnissen der neuropsychologischen Tests**

Um heraus zu finden, ob bei den Studienteilnehmern ein Zusammenhang zwischen der Höhe der Immunaktivierung und den Ergebnissen der neuropsychologischen Tests besteht, wurde eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt. Es wurden die Plasmakonzentrationen der Immunaktivierungsmarker suPAR und human LBP gegen die erreichten Punktzahlen in den Tests aufgetragen. Diese Analyse erfolgte stets getrennt für die Kontrollgruppe und die Gruppe der HIV-Patienten sowie für die Subgruppen HIV-Patienten mit ART und HIV-Patienten ohne ART.

### **4.7.1 Korrelationen zwischen den suPAR-Werten und den Ergebnissen der neuropsychologischen Tests**

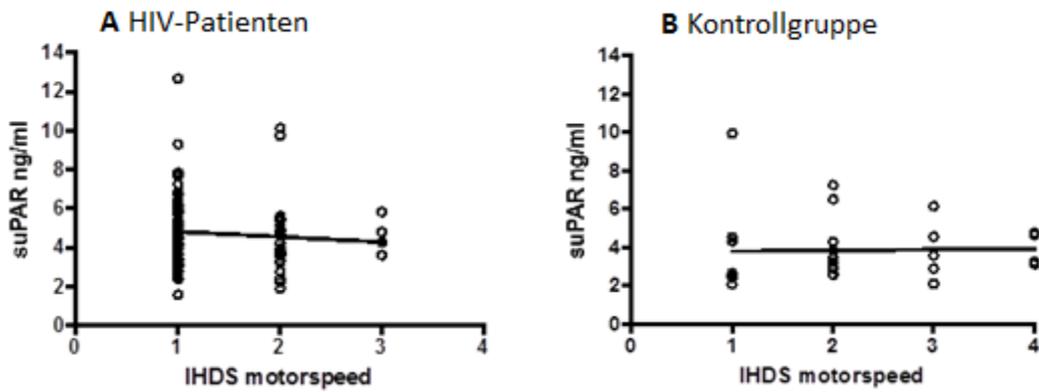
#### **4.7.1.1 Korrelationen zwischen den suPAR-Werten und den IHDS-Ergebnissen**

Sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Gruppe der HIV-Patienten besteht kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Plasmakonzentrationen des Immunaktivierungsmarkers suPAR und den totalen IHDS-Ergebnissen (Abbildung 4.15A, 4.15B). Betrachtet man aber beide Gruppen zusammen, ergibt sich mit  $p = 0,0314$  eine statistisch signifikante negative Korrelation (Abbildung 4.15C). Umso höher die suPAR-Konzentration und damit die Immunaktivierung ist, desto schlechter sind die IHDS-Ergebnisse. In einer Subuntersuchung der HIV-Patienten mit ART und der HIV-Patienten ohne ART konnten keine statistisch signifikanten Korrelationen der suPAR-Konzentrationen mit den IHDS-Ergebnissen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

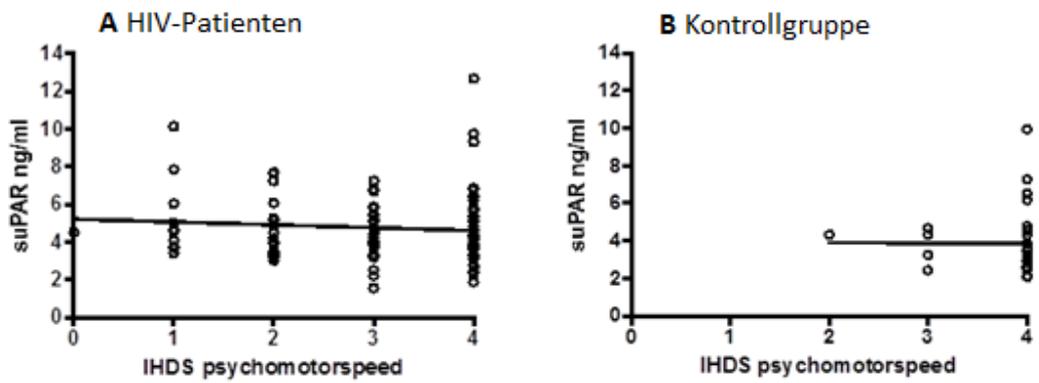


**Abbildung 4.15:** Korrelationen zwischen den suPAR-Konzentrationen und den IHDS-Ergebnissen: **A** HIV-Patienten (n = 112), keine signifikante Korrelation, p = 0,2149. **B** Kontrollgruppe (n = 30), keine signifikante Korrelation, p = 0,6501. **C** HIV-Patienten + Kontrollpersonen (n = 142), signifikant negative Korrelation, p = 0,0314.

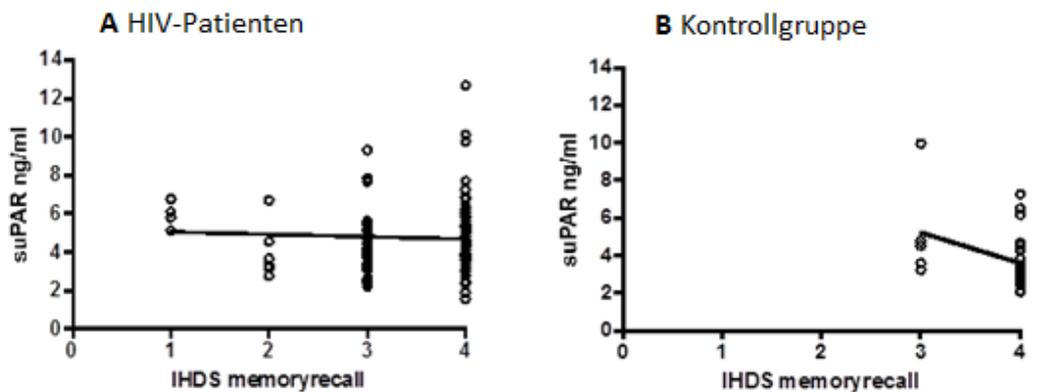
Diese totalen IHDS-Ergebnisse setzen sich aus den Ergebnissen der Tests IHDS-Motorspeed, IHDS-Psychomotorspeed und IHDS-Memoryrecall zusammen. Bei der Untersuchung der Zusammenhänge der Einzel-Ergebnisse dieser drei IHDS-Tests mit den suPAR-Konzentrationen, ergaben sich sowohl bei den HIV-Patienten als auch bei den Kontrollpersonen keine statistisch signifikanten Korrelationen (Abbildung 4.16, 4.17, 4.18). In der Subuntersuchung der HIV-Patienten mit ART und ohne ART konnten ebenfalls keine statistisch signifikanten Korrelationen der suPAR-Konzentrationen mit den IHDS-Motorspeed-, IHDS-Psychomotorspeed- und IHDS-Memoryrecall-Ergebnissen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 4.16:** Es bestehen keine statistisch signifikanten Korrelationen zwischen den suPAR-Konzentrationen und den IHDS-Motorspeed-Ergebnissen: **A** HIV-Patienten (n=112),  $p = 0,425$ . **B** Kontrollgruppe (n=30),  $p = 0,8806$ .



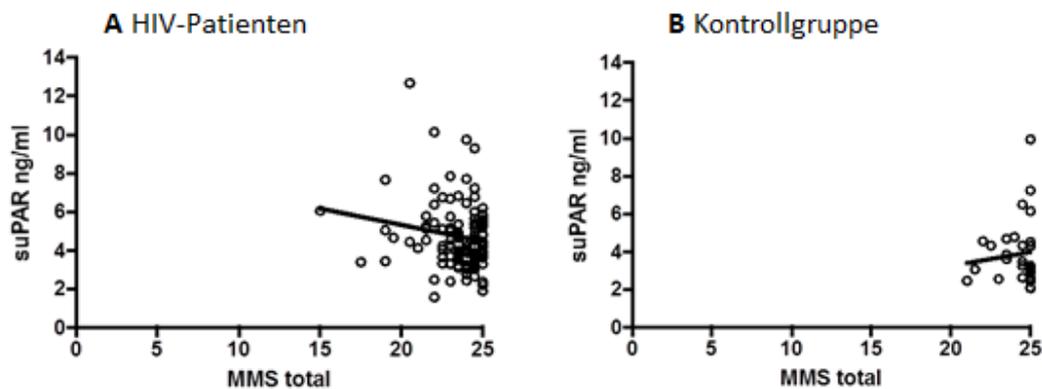
**Abbildung 4.17:** Es bestehen keine statistisch signifikanten Korrelationen zwischen den suPAR-Konzentrationen und den IHDS-Psychomotorspeed-Ergebnissen: **A** HIV-Patienten (n = 112),  $p = 0,3763$ . **B** Kontrollgruppe (n = 30),  $p = 0,9743$ .



**Abbildung 4.18:** Es bestehen keine statistisch signifikanten Korrelationen zwischen den suPAR-Konzentrationen und den IHDS-Memoryrecall-Ergebnissen: **A** HIV-Patienten (n = 112),  $p = 0,4350$ . **B** Kontrollgruppe (n = 30),  $p = 0,8806$ .

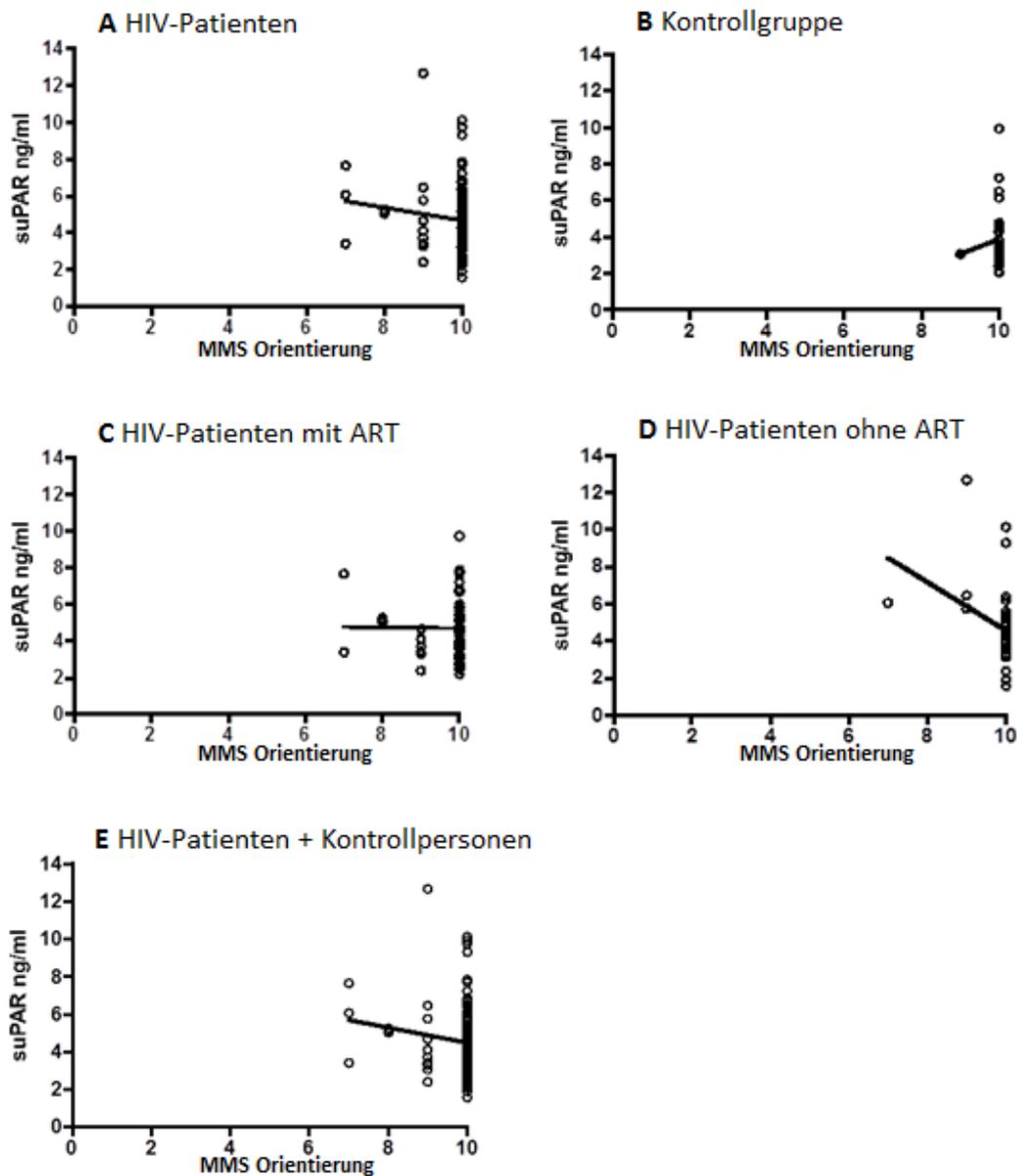
#### 4.7.1.2 Korrelationen zwischen den suPAR-Werten und den MMS-Ergebnissen

Es besteht weder in der Gruppe der HIV-Patienten, noch in der Kontrollgruppe ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den Konzentrationen des Immunaktivierungsmarkers suPAR und den totalen MMS-Ergebnissen (Abbildung 4.19A, 4.19B). Auch die Subuntersuchung der beiden Gruppen der HIV-Patienten mit und ohne ART ergab keine signifikanten Zusammenhänge (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 4.19:** Es bestehen keine statistisch signifikanten Korrelationen zwischen den suPAR-Konzentrationen und den totalen MMS-Ergebnissen: **A** HIV-Patienten (n = 112), p = 0,1134. **B** Kontrollgruppe (n = 30), p = 0,6086.

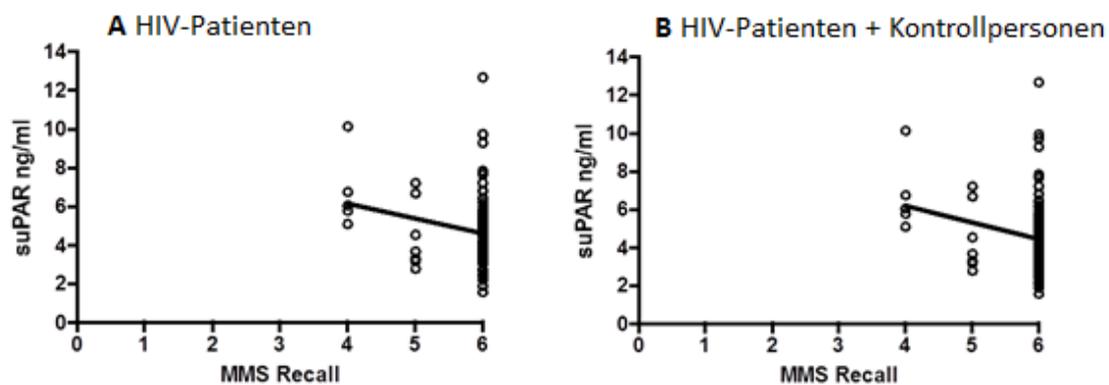
Bei der Untersuchung des MMS-Einzeltests Orientierung korrelieren in der Gruppe der HIV-Patienten und in der Kontrollgruppe die suPAR-Plasmakonzentrationen ebenfalls nicht statistisch signifikant mit den Testergebnissen (Abbildung 4.20A, 4.20B). Auch bei der gemeinsamen Betrachtung der Ergebnisse dieser beiden Gruppen ergibt sich kein signifikanter Zusammenhang (Abbildung 4.20E). In der Subuntersuchung der Gruppe der HIV-Patienten ohne ART liegt hingegen mit einem p von 0,0442 eine statistisch signifikant negative Korrelation vor (Abbildung 4.20D). Dieser Zusammenhang ist in der Gruppe der HIV-Patienten mit ART nicht zu sehen (Abbildung 4.20C).



**Abbildung 4.20:** Korrelationen zwischen den suPAR-Konzentrationen und den MMS-Orientierung-Ergebnissen: **A** HIV-Patienten (n = 112), keine signifikante Korrelation, p = 0,2401. **B** Kontrollgruppe (n = 30), keine signifikante Korrelation, p = 0,6472. **C** HIV-Patienten mit ART (n = 75), keine signifikante Korrelation, p = 0,9456. **D** HIV-Patienten ohne ART (n = 37), signifikant negative Korrelation, p = 0,0442. **E** HIV-Patienten + Kontrollpersonen (n = 142), keine signifikante Korrelation, p = 0,1645.

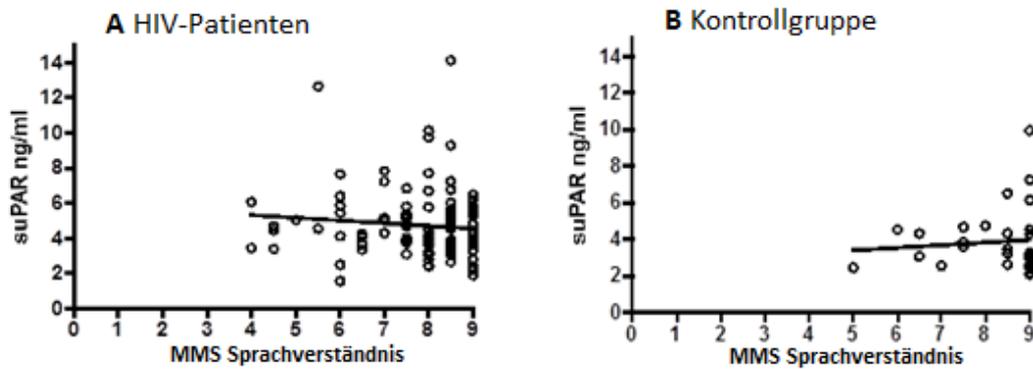
Die Analyse des MMS-Einzeltests Merkfähigkeit ergab bei den HIV-Patienten keine statistisch signifikanten Zusammenhänge zwischen den suPAR-Plasmakonzentrationen und den Testergebnissen (Abbildung 4.21A). In der Kontrollgruppe erreichten alle Probanden die Höchstpunktzahl (Daten nicht gezeigt). Nimmt man die Ergebnisse der

Kontrollgruppe und der HIV-Patienten zusammen, ist mit einem  $p$  von 0,0243 ein signifikant negativer Zusammenhang zu sehen (Abbildung 4.21B). Umso höher die suPAR-Plasmakonzentration eines Patienten ist, desto schlechter sind die Ergebnisse in diesem MMS-Subtest. Die Untersuchung der beiden Subgruppen der HIV-Patienten mit und ohne ART ergab bei dem MMS-Merkfähigkeit-Test keine signifikanten Zusammenhänge (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 4.21:** Korrelationen zwischen den suPAR-Konzentrationen und den MMS-Merkfähigkeit-Ergebnissen: **A** HIV-Patienten ( $n = 112$ ), keine signifikante Korrelation, aber ein Trend mit  $p = 0,0538$ . **B** HIV-Patienten + Kontrollpersonen ( $n = 142$ ), signifikant negative Korrelation,  $p = 0,0243$ .

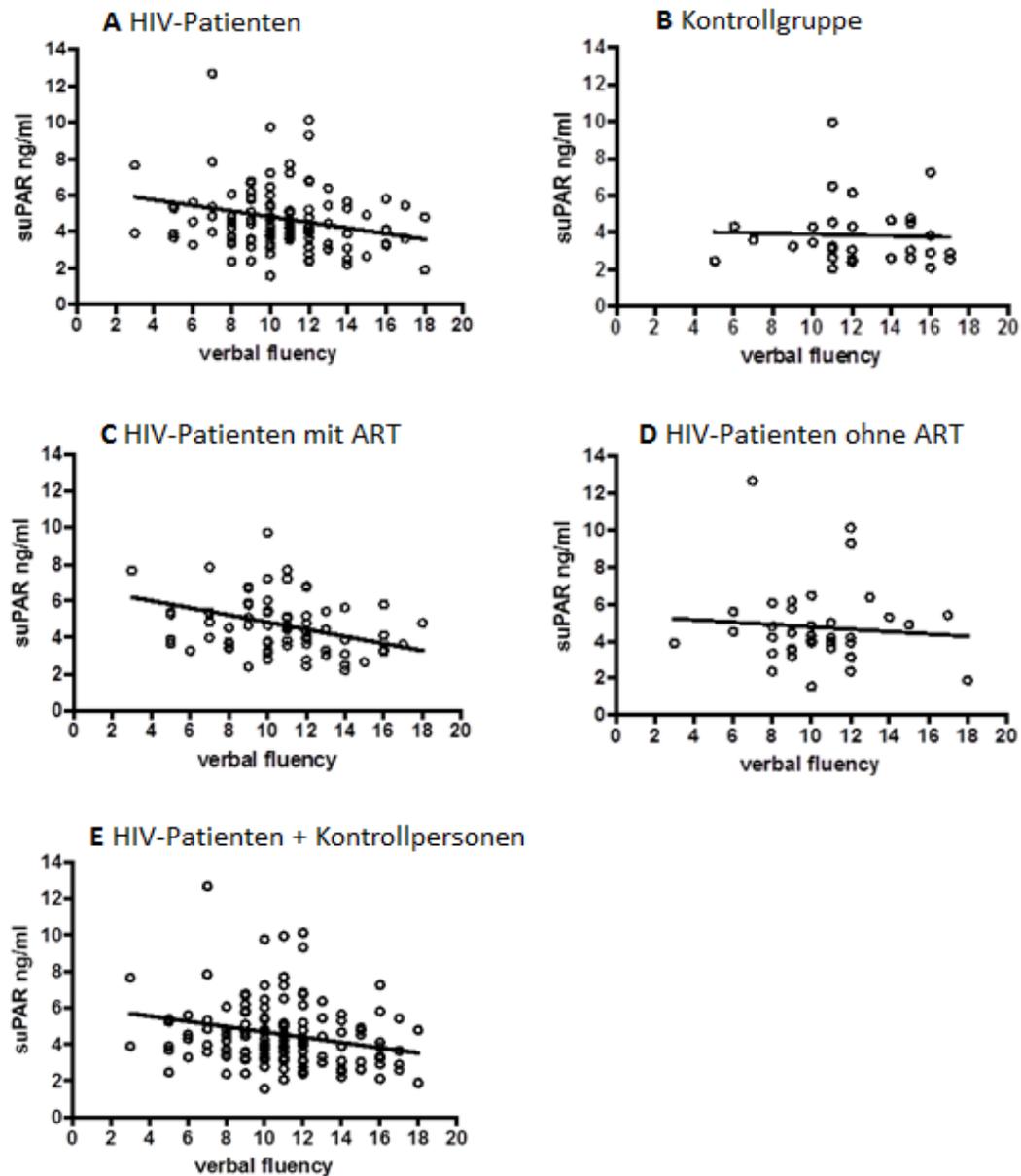
Die Untersuchung des dritten MMS-Subtests Sprachverständnis zeigte weder in der Kontrollgruppe noch bei den HIV-Patienten einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen den Plasmakonzentrationen des Immunaktivierungsmarkers suPAR und den Testergebnissen (Abbildung 4.22). Auch in der Subuntersuchung der HIV-Patienten mit ART und der HIV-Patienten ohne ART zeigten sich keine signifikanten Korrelationen (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 4.22:** Es bestehen keine statistisch signifikanten Korrelationen zwischen den suPAR-Konzentrationen und den MMS-Sprachverständnis -Ergebnissen: **A** HIV-Patienten (n = 112), p = 0,3084. **B** Kontrollgruppe (n =30), p = 0,6401.

#### 4.7.1.3 Korrelationen zwischen den suPAR-Werten und den Verbal-Fluency-Test-Ergebnissen

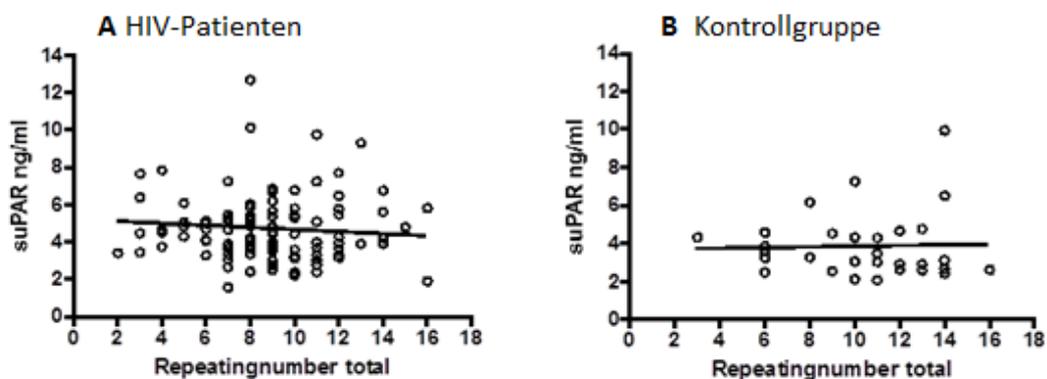
In der Gruppe der HIV-Patienten korrelieren die Ergebnisse des Verbal-Fluency-Tests signifikant negativ ( $p = 0,0126$ ) mit den Plasmakonzentrationen des Immunaktivierungsmarkers suPAR (Abbildung 4.23A). Je höher die suPAR-Konzentrationen der HIV-Patienten sind, desto niedriger ist die erreichte Testpunktzahl. Bei der Untersuchung der Untergruppe HIV-positiv mit ART tritt diese statistische Signifikanz mit einem p von 0,0052 noch deutlicher auf (Abbildung 4.23C). Bei der Untergruppe HIV-positiv ohne ART ist dieser signifikante Zusammenhang nicht vorhanden (Abbildung 4.23D). Auch in der Kontrollgruppe ist keine statistisch signifikante Korrelation zu beobachten (Abbildung 4.23B). Nimmt man die Ergebnisse aller Probanden (HIV-Patienten und Kontrollpersonen) zusammen, ergibt sich mit einem p von 0,0056 eine statistisch signifikante Korrelation zwischen den suPAR-Konzentrationen und den Testergebnissen (Abbildung 4.23E).



**Abbildung 4.23:** Korrelationen zwischen den suPAR-Konzentrationen und den Verbal-Fluency-Test-Ergebnissen: **A** HIV-Patienten (n = 112), signifikant negative Korrelation,  $p = 0,0126$ . **B** Kontrollgruppe (n = 30), keine signifikante Korrelation,  $p = 0,8436$ . **C** HIV-Patienten mit ART (n = 75), signifikant negative Korrelation,  $p = 0,0052$ . **D** HIV-Patienten ohne ART (n = 37), keine signifikante Korrelation,  $p = 0,621$ . **E** HIV-Patienten + Kontrollpersonen (n = 142), signifikant negative Korrelation,  $p = 0,0056$ .

#### 4.7.1.4 Korrelationen zwischen den suPAR-Werten und den Digit-Span-Test-Ergebnissen

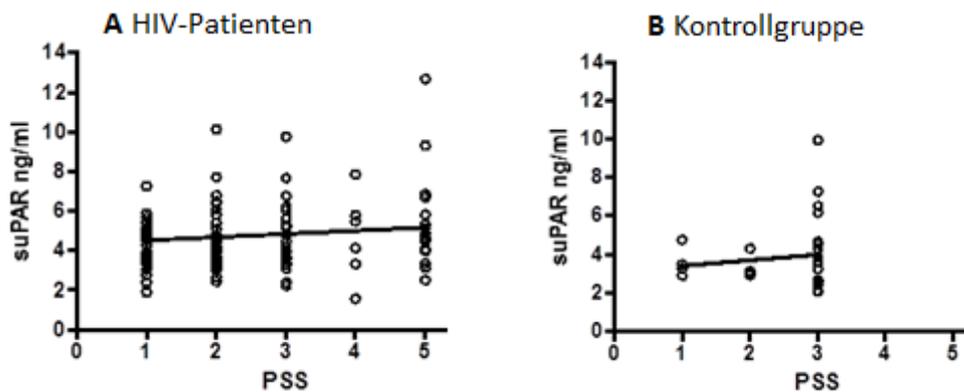
Sowohl in der Gruppe der HIV-Patienten als auch in der Kontrollgruppe bestehen keine statistisch signifikanten Korrelationen zwischen den Konzentrationen des Immunaktivierungsmarkers suPAR und den Ergebnissen des Digit Span Tests (Abbildung 4.24). In der Subuntersuchung der Gruppen der HIV-Patienten mit antiretroviraler Therapie und ohne dieser Therapie wurden ebenfalls keine signifikanten Korrelationen festgestellt (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 4.24:** Es bestehen keine statistisch signifikanten Korrelationen zwischen den suPAR-Konzentrationen und den Digit-Span-Test-Ergebnissen: **A** HIV-Patienten (n = 112), p = 0,3765. **B** Kontrollgruppe (n = 30), p = 0,8703.

#### 4.7.1.5 Korrelationen zwischen den suPAR-Werten und den Pictorial-Sleepiness-Scale-Ergebnissen

Es ergaben sich zwischen den Konzentrationen des Immunaktivierungsmarkers und den Ergebnissen der Pictorial Sleepiness Scale weder bei den HIV-Patienten noch bei den Kontrollpersonen statistisch signifikante Zusammenhänge (Abbildung 4.25). In der Subuntersuchung der Werte der HIV-Patienten mit und ohne ART zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Zusammenhänge (Daten nicht gezeigt).

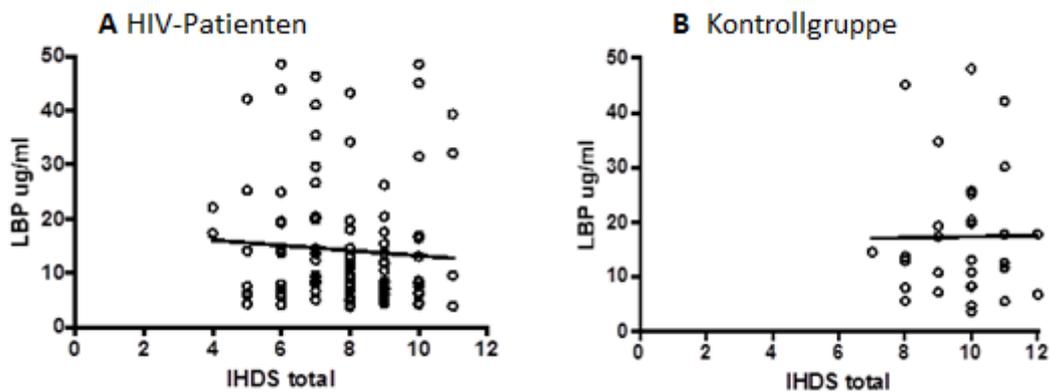


**Abbildung 4.25:** Es bestehen keine statistisch signifikanten Korrelationen zwischen den suPAR-Konzentrationen und den Pictorial-Sleepiness-Scale-Ergebnissen: **A** HIV-Patienten (n = 112), p = 0,2386. **B** Kontrollgruppe (n = 30), p = 0,5136.

#### 4.7.2 Korrelationen zwischen den human LBP-Werten und den Ergebnissen der neuropsychologischen Tests

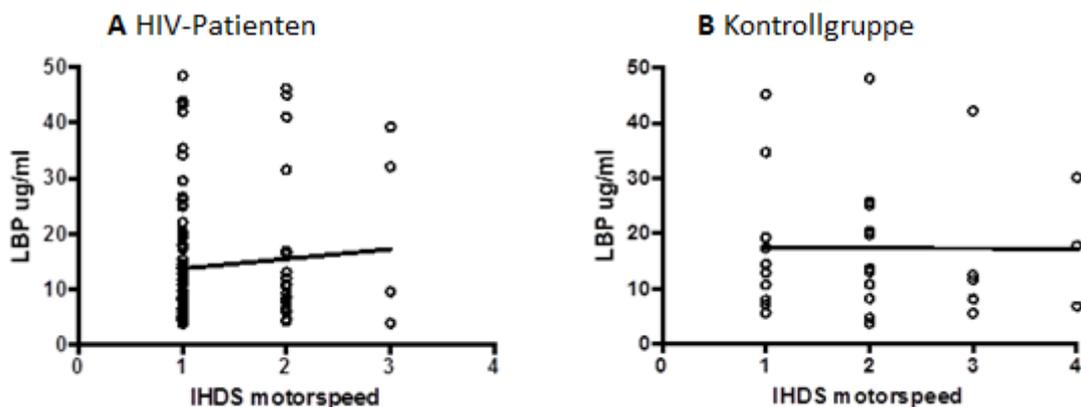
##### 4.7.2.1 Korrelationen zwischen den human LBP-Werten und den IHDS-Ergebnissen

Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den Konzentrationen des Immunaktivierungsmarkers human LBP und den totalen IHDS-Ergebnissen besteht weder bei den HIV-Patienten noch bei den Kontrollpersonen (Abbildung 4.26). Bei der Subuntersuchung der HIV-Patienten mit ART und der HIV-Patienten ohne ART ergaben sich ebenso keine signifikanten Korrelationen (Daten nicht gezeigt).

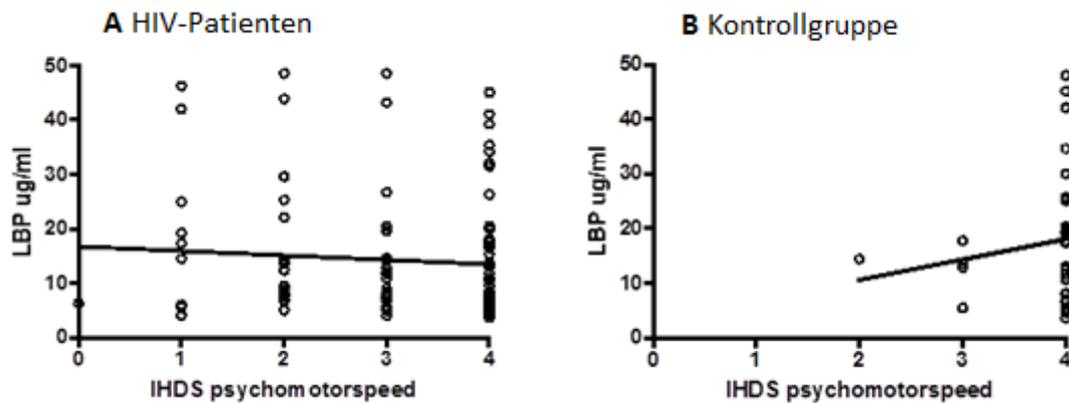


**Abbildung 4.26:** Es bestehen keine statistisch signifikanten Korrelationen zwischen den human LBP-Konzentrationen und den IHDS-Ergebnissen: **A** HIV-Patienten (n = 112), p = 0,2149. **B** Kontrollgruppe (n =30), p = 0,6501.

Bei der Untersuchung der drei IHDS-Einzeltests zeigten sich bei den Tests IHDS-Motorspeed und IHDS-Psychomotorspeed in der Gruppe der HIV-Patienten und in der Kontrollgruppe keine statistisch signifikanten Korrelationen (Abbildung 4.27, 4.28). Auch die Subuntersuchung der HIV-Patienten mit und ohne antiretroviraler Therapie ergab keine signifikanten Zusammenhänge (Daten nicht gezeigt).

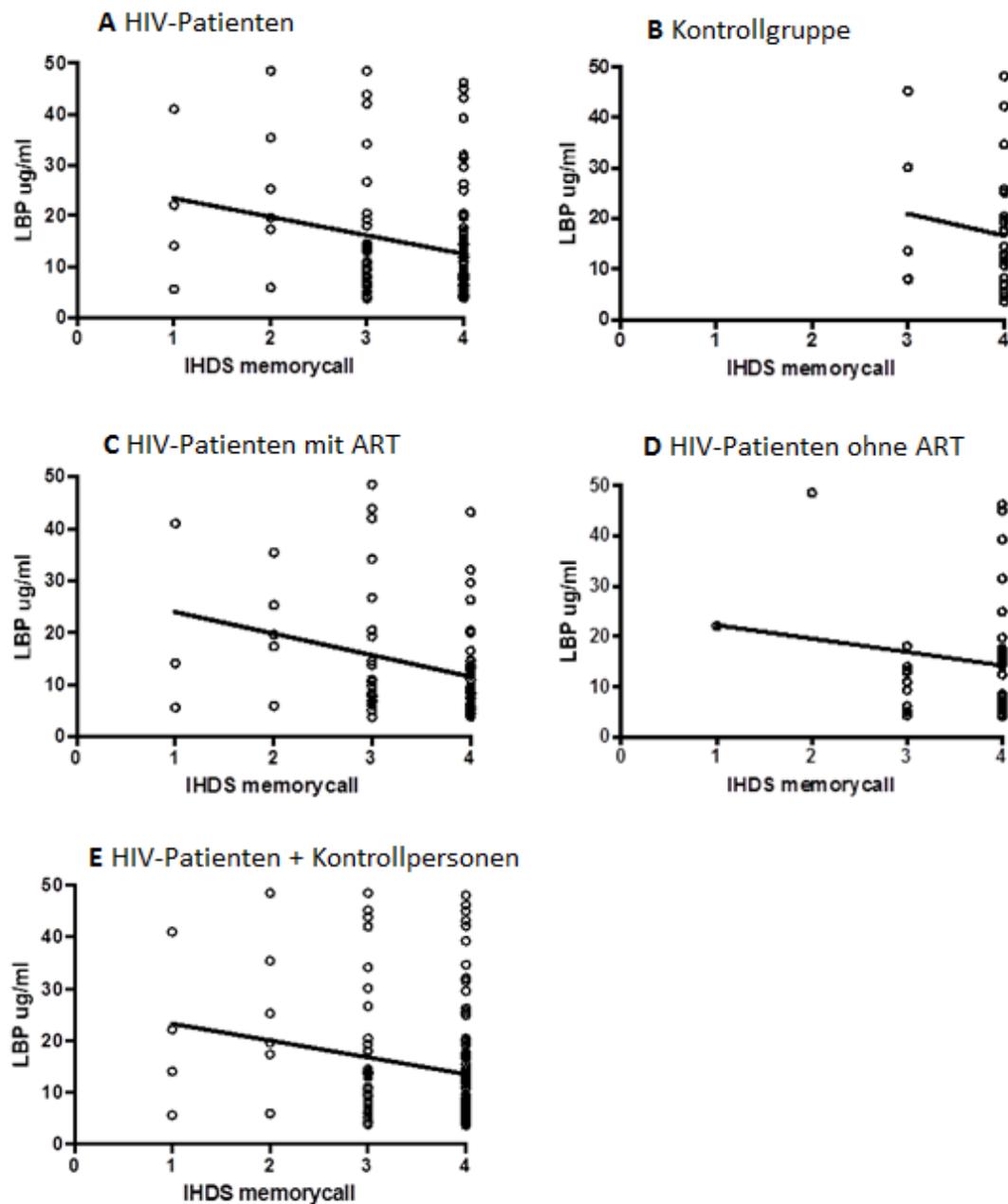


**Abbildung 4.27:** Es bestehen keine statistisch signifikanten Korrelationen zwischen den human LBP-Konzentrationen und den IHDS-Motorspeed-Ergebnissen: **A** HIV-Patienten (n = 112), p = 0,3858. **B** Kontrollgruppe (n =30), p = 0,9706.



**Abbildung 4.28:** Es bestehen keine statistisch signifikanten Korrelationen zwischen den human LBP-Konzentrationen und den IHDS-Psychomotorspeed-Ergebnissen: **A** HIV-Patienten (n = 112), p = 0,4208. **B** Kontrollgruppe (n = 30), p = 0,4312.

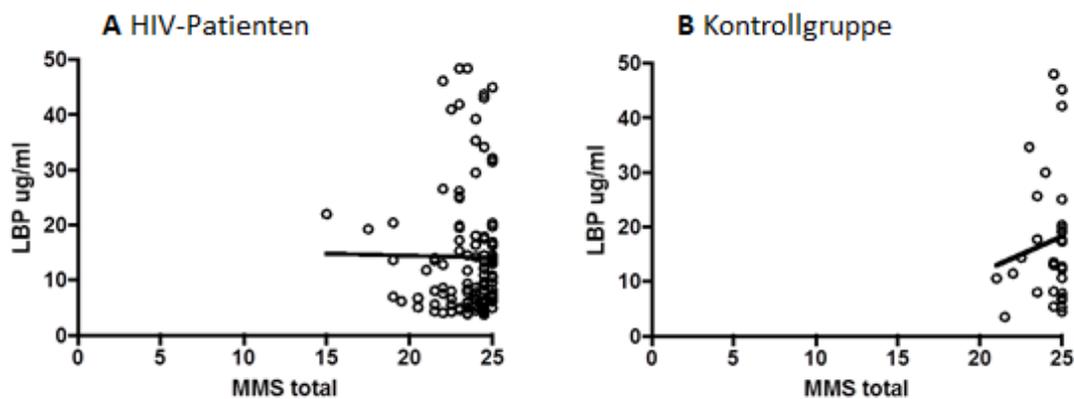
Die Ergebnisse des IHDS-Memoryrecall-Einzeltests korrelieren bei den HIV-Patienten statistisch signifikant negativ ( $p = 0,0095$ ) mit den Konzentrationen des Immunaktivierungsmarkers human LBP (Abbildung 4.29A). Eine höhere human LBP-Konzentration geht mit einer niedrigeren Punktzahl des IHDS-Memoryrecall-Tests einher. Auch bei der Subuntersuchung der HIV-Patienten mit ART ergab sich mit einem p von 0,0089 ein signifikant negativer Zusammenhang (Abbildung 4.29C). In der Kontrollgruppe und in der Gruppe der HIV-Patienten ohne ART ist diese Beziehung nicht vorhanden (Abbildung 4.29B, 4.29D). Bei der gemeinsamen Betrachtung der Ergebnisse der HIV-Patienten und der Kontrollpersonen ist mit einem p von 0,0182 ein statistisch signifikant negativer Zusammenhang zu sehen (Abbildung 4.29E).



**Abbildung 4.29:** Korrelationen zwischen den human LBP-Konzentrationen und den IHDS-Memorycall-Ergebnissen: **A** HIV-Patienten (n = 112), signifikant negative Korrelation,  $p = 0,0095$ . **B** Kontrollgruppe (n = 30), keine signifikante Korrelation,  $p = 0,4725$ . **C** HIV-Patienten mit ART (n = 75), signifikant negative Korrelation,  $p = 0,0089$ . **D** HIV-Patienten ohne ART (n = 37), keine signifikante Korrelation,  $p = 0,3750$ . **E** HIV-Patienten + Kontrollpersonen (n = 142), signifikant negative Korrelation,  $p = 0,0182$ .

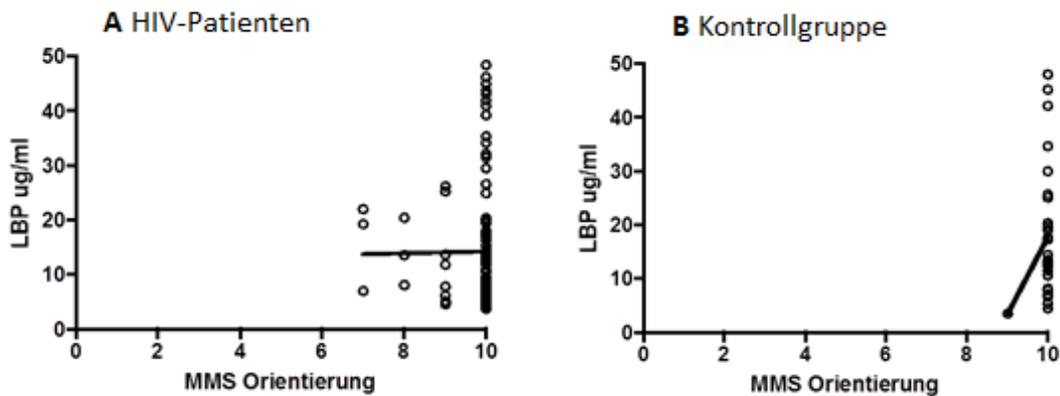
#### 4.7.2.2 Korrelationen zwischen den human LBP-Werten und den MMS-Ergebnissen

Es ergaben sich in der Gruppe der HIV-Patienten und in der Kontrollgruppe keine statistisch signifikanten Zusammenhänge zwischen den Konzentrationen des Immunaktivierungsmarkers human LBP und den totalen MMS-Ergebnissen (Abbildung 4.30). Bei der Subuntersuchung der HIV-Patienten mit ART und ohne ART zeigten sich gleichfalls keine signifikanten Korrelationen (Daten nicht gezeigt).

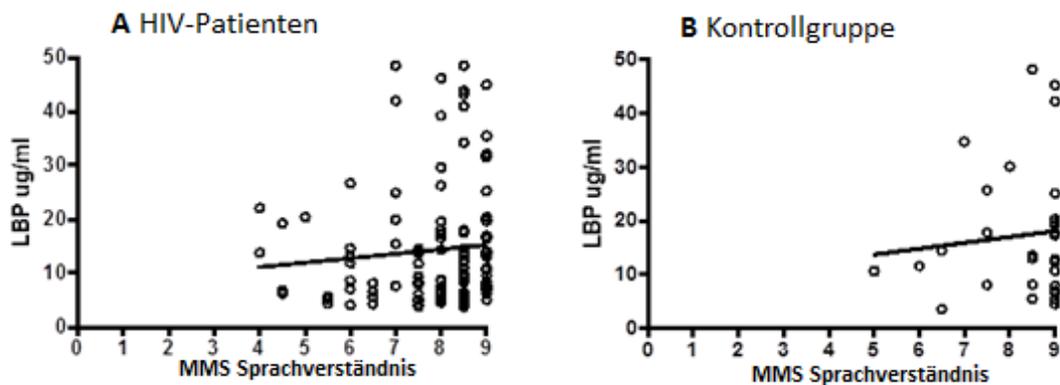


**Abbildung 4.30:** Es bestehen keine statistisch signifikanten Korrelationen zwischen den human LBP-Konzentrationen und den totalen MMS-Ergebnissen: **A** HIV-Patienten (n = 112), p = 0,9079. **B** Kontrollgruppe (n =30), p = 0,5062.

Auch die Analyse der MMS-Einzeltests Orientierung und Sprachverständnis zeigte keine signifikanten Zusammenhänge zwischen der human LBP-Plasmakonzentration und den Testpunktzahlen (Abbildung 4.31, 4.32)



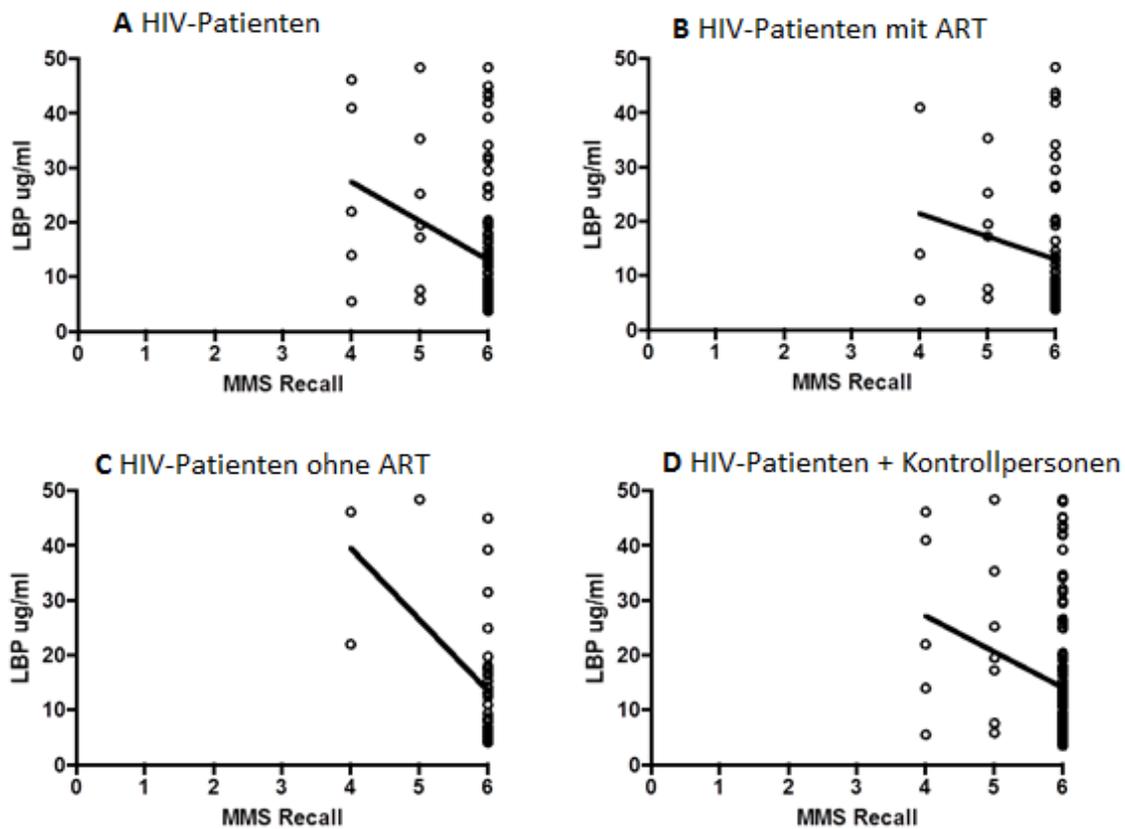
**Abbildung 4.31:** Es bestehen keine statistisch signifikanten Korrelationen zwischen den human LBP-Konzentrationen und den MMS-Orientierung-Ergebnissen: **A** HIV-Patienten (n = 112), p = 0,9279. **B** Kontrollgruppe (n = 30), p = 0,2561.



**Abbildung 4.32:** Es bestehen keine statistisch signifikanten Korrelationen zwischen den human LBP-Konzentrationen und den MMS-Sprachverständnis-Ergebnissen: **A** HIV-Patienten (n = 112), p = 0,3375. **B** Kontrollgruppe (n = 30), p = 0,6050.

Bei der Untersuchung des MMS-Einzeltests Merkfähigkeit hingegen ergab sich bei den HIV-Patienten ein signifikant negativer Zusammenhang ( $p = 0,0015$ ) zwischen der Plasmakonzentration des Immunaktivierungsmarkers human LBP und den Testergebnissen (Abbildung 4.33A). In der Kontrollgruppe erreichten alle Probanden die Höchstpunktzahl (Daten nicht gezeigt). Die Subuntersuchung der HIV-Patienten ohne ART zeigte ebenfalls eine statistisch signifikante negative Korrelation mit einem p von 0,0012 (Abbildung 4.33C). Dieser Zusammenhang war in der Gruppe der HIV-Patienten mit ART nicht zu beobachten (Abbildung 4.33B). Bei der gemeinsamen Betrachtung aller

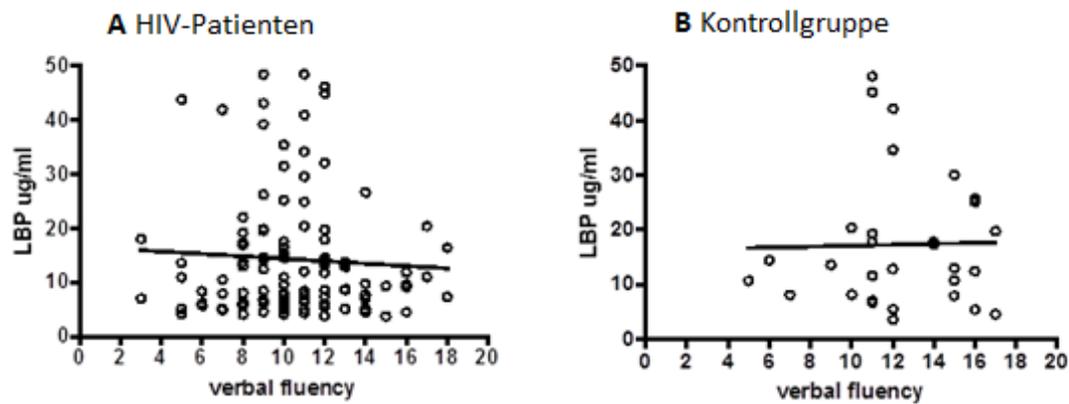
HIV-Patienten und der Kontrollpersonen, ergab sich mit einem  $p$  von 0,0041 gleichfalls ein signifikant negativer Zusammenhang (Abbildung 4.33D). Je höher die human LBP-Plasmakonzentration ist, desto schlechter fällt das Ergebnis des MMS-Merkfähigkeitstests aus.



**Abbildung 4.33:** Korrelationen zwischen den human LBP-Konzentrationen und den MMS-Merkfähigkeit-Ergebnissen: **A** HIV-Patienten ( $n = 112$ ), signifikant negative Korrelation,  $p = 0,0015$ . **B** HIV-Patienten mit ART ( $n = 75$ ), keine signifikante Korrelation,  $p = 0,1245$ . **C** HIV-Patienten ohne ART ( $n = 37$ ), signifikant negative Korrelation,  $p = 0,0012$ . **D** HIV-Patienten + Kontrollpersonen ( $n = 142$ ), signifikant negative Korrelation,  $p = 0,0041$ .

#### 4.7.2.3 Korrelationen zwischen den human LBP-Werten und den Verbal-Fluency-Test-Ergebnissen

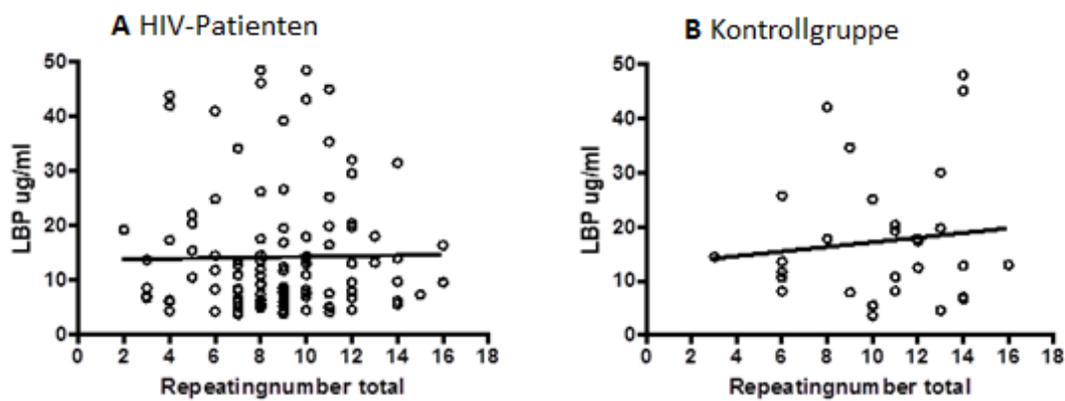
Sowohl in der Gruppe der HIV-Patienten als auch in der Kontrollgruppe liegen keine statistisch signifikanten Korrelationen zwischen den human LBP-Konzentrationen und den Ergebnissen des Verbal-Fluency-Tests vor (Abbildung 4.34). Bei den HIV-Patienten mit und ohne ART ergaben sich in der Subuntersuchung ebenfalls keine signifikanten Zusammenhänge (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 4.34:** Es bestehen keine statistisch signifikanten Korrelationen zwischen den human LBP-Konzentrationen und den Verbal-Fluency-Test-Ergebnissen: **A** HIV-Patienten (n = 112), p = 0,54. **B** Kontrollgruppe (n =30), p = 0,9104.

#### 4.7.2.4 Korrelationen zwischen den human LBP-Werten und den Digit-Span-Test-Ergebnissen

Zwischen den human LBP-Konzentrationen und den Ergebnissen des Digit-Span-Tests zeigten sich weder bei den HIV-Patienten noch bei den Kontrollpersonen statistisch signifikanten Korrelationen (Abbildung 4.35). GleichermäÙen ergab die Subuntersuchung der HIV-Patienten mit ART und der HIV- Patienten ohne ART keine signifikanten Zusammenhänge (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 4.35:** Es bestehen keine statistisch signifikanten Korrelationen zwischen den human LBP-Konzentrationen und den Digit-Span-Test-Ergebnissen: **A** HIV-Patienten (n = 112), p = 0,8761. **B** Kontrollgruppe (n =30), p = 0,5566.

#### **4.8 Korrelationen mit dem genetischen Polymorphismus DAT**

Es wurde untersucht, ob Zusammenhänge zwischen den unterschiedlichen Varianten des DAT-Polymorphismus und den Konzentrationen der Immunaktivierungsmarker suPAR und human LBP sowie den HIV-Protease Subtypen bestehen. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Korrelationen (Daten nicht gezeigt).

Die Prüfung, ob die verschiedenen Varianten des DAT-Polymorphismus die Ergebnisse des neuropsychologischen Tests beeinflussen, ergab ebenfalls keine statistisch signifikanten Korrelationen (Daten nicht gezeigt).

## **5. Diskussion**

### **5.1 HIV-Protease Subtyp**

Die Bestimmung des HIV-Protease Subtyps erfolgte mit dem Ziel, den Einfluss der verschiedenen Subtypen auf die HIV- und HAND-Pathogenese zu untersuchen. Hierfür sollte erstens geprüft werden, ob ein bestimmter Subtyp stärker mit neuropsychologischen Beeinträchtigungen einhergeht als die anderen Subtypen (s. 4.1.2). Zweitens sollte getestet werden, ob die unterschiedlichen Subtypen unterschiedlich hohe Immunaktivierungen hervorrufen (s. 4.1.3).

#### **5.1.1 Verteilung der HIV-Protease Subtypen in HIV-Patienten aus Tansania**

Afrika stellt die Region mit der größten Vielfalt an HIV-Subtypen dar. Bisherige Studien zur HIV-1 Subtypenverteilung in Tansania ergaben variierende prozentuale Angaben, bei denen Subtyp A, C und D seit einigen Jahren stets den größten Anteil unter sich ausmachten. Aktuell spielen auch rekombinante Formen eine immer größer werdende Rolle und sind in bis zu 50% der Infektionen nachweisbar. Neben der zeitlichen Entwicklung der Subtypenverteilung existieren zum Teil auch starke regionale Unterschiede. So wurde gezeigt, dass in der Region um Mwanza, rund um den Victoriasee, vorwiegend die Varianten A und C vorkommen (s. 1.1.4) (Herbinger et al., 2006; Njai et al., 2013; Nyombi et al., 2008).

In der im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Studiengruppe wurden die Subtypen A (21%), C (23%) und D (26%) am Häufigsten nachgewiesen (s. 4.3). Auch die rekombinante Form CRF01\_AE macht einen großen Anteil aus (19%). Diese Ergebnisse stimmen im Allgemeinen mit den Ergebnissen anderer Studien (s.o.) überein. Nur der große Anteil des Subtyp D für Mwanza, woher die untersuchten Proben stammen, weicht von den Resultaten bisheriger Studien ab (Njai et al., 2013).

Da jedoch nicht das gesamte HIV-Genom, sondern nur der Genabschnitt, der für die HIV-Protease codiert, für die vorliegende Arbeit untersucht wurde, repräsentieren die Ergebnisse die Subtypen für eben diese Genom-Region und bieten somit nur einen Anhaltspunkt. Es ist davon auszugehen, dass die Untersuchung der gesamten Genom-

Sequenz teilweise abweichende Resultate für den HIV-Subtyp ergeben würde. Beispielsweise könnten in anderen Genomabschnitten andere Subtypen vorliegen und somit insgesamt deutlich mehr rekombinante Formen resultieren. Auch Mehrfachinfektionen eines Individuums mit unterschiedlichen HIV-Subtypen oder verschiedenen Varianten eines Subtyps sind denkbar. Um daher eine Aussage über die Verteilung der gesamten HIV-Subtypen für die untersuchte Kohorte treffen zu können, wären Sequenzanalysen des kompletten HIV-Genoms notwendig.

### **5.1.2 HIV-Protease Subtyp A als Risikofaktor für HAND**

Es existieren verschiedene Wirtsfaktoren, die die Entstehung von HAND beeinflussen können (s. 1.2.2). Auch virologische Faktoren werden in diesem Zusammenhang diskutiert, wie z.B. der Einfluss des HIV-Subtyps auf die neuropsychologische Performance. Zu diesem Thema wurden verschiedene Studien durchgeführt, die jedoch unterschiedliche Ergebnisse hervor bringen. So beschreibt eine Studie, dass der HIV-Subtyp D verglichen mit Subtyp A stärker mit dementiellen Symptomen einhergeht, während eine andere Studie genau entgegengesetzte Ergebnisse mit Subtyp A als Indikator für stärkere neurologische Beeinträchtigung veröffentlicht hat (Boivin et al., 2010; Ned Sacktor et al., 2009).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen den verschiedenen HIV-Subtypen und den Ergebnissen der neuropsychologischen Tests ebenfalls untersucht. Die Probanden, die mit dem HIV-Protease Subtyp A oder CRF01\_AE infiziert sind, erzielten signifikant schlechtere IHDS-Ergebnisse als die Probanden, die mit einem der anderen HIV-Protease Subtypen (C, D, B) infiziert sind (s. 4.6). Dieses Resultat führt zu der Überlegung, dass der HIV-Protease Subtyp A bzw. rekombinante Formen, die ebenfalls Teile des Subtyps A enthalten, mit stärkeren neuropsychologischen Beeinträchtigungen einhergehen und somit einen Risikofaktor für die Entwicklung von HAND darstellen. Folglich unterstützen die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse die Studie von Boivin et al., in der ebenfalls Subtyp A mit einer schlechteren neuropsychologischen Performance in Verbindung gebracht wird (Boivin et al., 2010). Die Veröffentlichung von Sacktor et al., dass Subtyp D stärker mit neurologischen Symptomen assoziiert ist, kann hingegen nicht bestätigt werden (Ned Sacktor et al., 2009).

Bei einem Vergleich mit den Ergebnissen aus den beiden oben genannten Studien müssen allerdings mehrere Aspekte beachtet werden. Zum einen, dass für die vorliegende Arbeit nur der HIV-Protease Subtyp und nicht der gesamte HIV-Subtyp bestimmt wurde. Der untersuchte Abschnitt befindet sich in der pol-Region des HIV-Genoms. Auch in den beiden anderen, oben genannten Studien wurde nicht das komplette HIV-Genom zur Subtypbestimmung herangezogen. Während Sacktor et al. Abschnitte der gag-Region und der gp41 env-Region untersuchten, erfolgte die Subtypbestimmung von Boivin et al. aus deutlich mehr Regionen (gag, pol, vpu, gp120 env, gp41 env). Des Weiteren muss beachtet werden, dass in den beiden Studien teilweise andere neuropsychologische Tests durchgeführt wurden. Der in der vorliegenden Arbeit dargestellte Zusammenhang zwischen dem HIV-Protease Subtyp A bzw. CRF01\_AE und einer schlechteren neuropsychologischer Performance konnte nur für den IHDS-Test gezeigt werden. Die Ergebnisse der anderen neuropsychologischen Tests (MMS, Verbal Fluency Test, Digit Span Test, Pictorial Sleepiness Scale) fielen ohne signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen HIV-Protease Subtypen aus. Hier wären Untersuchungen mit einer größeren Anzahl an Probanden notwendig, um zu sehen, ob auch bei diesen Tests ein ähnlicher Zusammenhang zu beobachten ist. Ein weiterer Unterschied zu den beiden anderen Studien, in denen nur ART naive Patienten untersucht wurden, ist, dass an der HAND1 Studie sowohl ART naive Patienten als auch Patienten mit ART teilnahmen. Außerdem testete die Studie von Boivin et al. das Auftreten von neuropsychologischen Symptomen bei Kindern wohingegen die Studie von Sacktor et al. sowie die HAND1 Studie erwachsene Probanden untersuchte.

Um herauszufinden, ob eine Infektion mit dem HIV-Subtyp A tatsächlich einen Risikofaktor für die Entwicklung von HAND darstellt, sind weitere Studien mit einer größeren Anzahl an HIV-Patienten, einheitlichen neuropsychologischen Tests und einer Subtypbestimmung aus dem gesamten Genom notwendig. Sollte sich der Zusammenhang bestätigen, muss über das Therapiemanagement bei einer Infektion mit dem HIV-Subtyp A bzw. entsprechenden Rekombinanten nachgedacht werden. So sollte beispielsweise thematisiert werden, ob ein früherer Beginn der Antiretroviralen Therapie bei Infektionen mit diesen Subtypen einen Vorteil bringt und die Entstehung von HAND verzögern oder sogar verhindern kann.

### 5.1.3 HIV-Protease Subtyp C geht mit niedrigerer Immunaktivierung einher

Es ist bekannt, dass eine hohe chronische Immunaktivierung im Rahmen einer HIV-Infektion mit der Krankheitsprogression korreliert. Auch die Entwicklung von HAND wird mit einer hohen Immunaktivierung im ZNS in Zusammenhang gebracht (s. 1.3) (Gannon et al., 2011; Ostrowski, 2010). Die Höhe der Immunaktivierung wird durch viele verschiedene Faktoren beeinflusst. Welche Faktoren im Detail hierbei eine Rolle spielen ist noch nicht vollständig erforscht.

In diesem Zusammenhang wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der verschiedenen HIV-Protease Subtypen auf die Immunaktivierung untersucht. Sowohl die Konzentrationen des Immunaktivierungsmarkers suPAR als auch die des Immunaktivierungsmarkers human LBP zeigen keine signifikanten Unterschiede bei den verschiedenen HIV-Protease Subtypen (s. 4.5). Aufgrund dieses Ergebnisses wäre davon auszugehen, dass der HIV-Subtyp keinen Einfluss auf die Höhe der Immunaktivierung und somit auch nicht auf die Krankheitsprogression hat. Allerdings ist ein nicht signifikanter Trend zu sehen, dass bei einer Infektion mit dem HIV-Protease Subtyp C im Mittel niedrigere Konzentrationen des Immunaktivierungsmarkers suPAR vorliegen. Diese Beobachtung, dass der HIV-Protease Subtyp C eine niedrigere Immunaktivierung hervorruft, führt zu der Überlegung, dass der HIV-Subtyp C weniger pathogen als die anderen Subtypen sein könnte. Auch das SI-Virus löst bei einer Infektion seines natürlichen Wirts (African Green Monkey) eine deutlich geringere chronische Immunaktivierung aus als bei einer Infektion von bestimmten anderen Affenarten. Dies soll mit ursächlich dafür sein, dass SIV für seinem natürlichen Wirt nicht pathogen ist und somit keine Krankheitssymptome auslöst (Manches & Bhardwaj, 2009). Geht man davon aus, dass die Immunaktivierung auch eine Rolle in der Pathogenese von HAND spielt (s. 4.2.3), so müssten Patienten, die mit dem HIV-Subtyp C infiziert sind aufgrund der niedrigeren Immunaktivierung ein geringeres Risiko für die Entwicklung von HAND haben. Dieser Zusammenhang konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht beobachtet werden (s. 4.6). Tatsächlich gibt es aber Studien, die gezeigt haben, dass der HIV-Subtyp C mit mildereren kognitiven Einschränkungen einhergeht (Rao et al., 2008).

Der in dieser Arbeit beobachtete Trend sollte zu Untersuchungen Anlass geben, ob bei dem HIV-Subtyp C ähnliche Zusammenhänge wie bei SIV bestehen und dieser Virus-

Subtyp möglicherweise eine im Vergleich geringere Pathogenität besitzt. Hierfür sind weitere Studien mit einer größeren Anzahl an Probanden, einer Subtypbestimmung aus dem gesamten HIV-Genom sowie der Bestimmung weiterer Immunaktivierungsmarker nötig.

## **5.2 Immunaktivierung**

Die Höhe der Immunaktivierung, die mittels der Immunaktivierungsmarker suPAR und human LBP bestimmt wurde, sollte in Hinblick auf Unterschiede zwischen den ART naiven HIV-Patienten, den HIV Patienten mit ART und den Kontrollpersonen untersucht werden (s. 4.2.1 und 4.2.2). Des Weiteren war ein Ziel, herauszufinden, ob eine hohe Immunaktivierung in der Peripherie ein Risikofaktor für die Entwicklung von HAND darstellt (s.4.2.3).

### **5.2.1 Höhere Immunaktivierung in HIV-Patienten als in Kontrollpersonen**

Es ist bekannt, dass eine chronische Immunaktivierung, die im Rahmen einer HIV-Infektion auftritt, mit der Krankheitsprogression korreliert und auch als ursächlich für das Voranschreiten der HIV-Erkrankung angesehen wird (s. 1.1.2) (Kasang et al., 2012; Ostrowski, 2010). Die für die vorliegende Arbeit durchgeführte Bestimmung der Immunaktivierung ergab signifikante Unterschiede zwischen den HIV-Patienten und den Kontrollpersonen, wobei die HIV-Patienten deutlich höhere Konzentrationen des Immunaktivierungsmarkers suPAR aufweisen (s. 4.4.1). Dieses Ergebnis stimmt mit den Resultaten anderer Veröffentlichungen überein und unterstützt die Annahme, dass die Immunaktivierung eine wichtige Rolle in der HIV-Infektion spielt.

### **5.2.2 ART hat bei HIV-Patienten aus Tansania keinen Einfluss auf die Immunaktivierung**

Bei HIV-Patienten, die eine Antiretrovirale Therapie erhalten, sollte als Zeichen für den Therapieerfolg die Konzentration der Immunaktivierungsmarker wieder sinken (Kasang et al., 2012). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch weder für den

Immunaktivierungsmarker suPAR noch für den Immunaktivierungsmarker human LBP Unterschiede zwischen den HIV-Patienten mit ART und denen ohne ART (s. 4.4).

Die Beobachtung, dass die Immunaktivierung trotz Therapie nicht sinkt und somit die Therapie unwirksam ist, kann mehrere Ursachen haben. Zum einen kann der Grund in der Verordnung falscher Medikamente liegen. Zum anderen, kann auch die Non-Compliance des Patienten der Grund sein. Das heißt, dass der Patient die Medikamente z.B. aufgrund von Nebenwirkungen oder Scham nicht einnimmt. Auch der Weiterverkauf der Medikamente oder die Weitergabe an Familienangehörige ist vor allem in Afrika, wo der Zugang zur HIV-Therapie schwierig ist, nicht selten eine Ursache für die Non-Compliance. Eine weitere Erklärung für die Unwirksamkeit der Therapie stellt die vermehrte Entwicklung von Resistenzen gegen die HIV-Medikamente dar. Auch hier besteht das Problem am stärksten in den afrikanischen Ländern, wo eine Resistenztestung vor Therapiebeginn nicht durchgeführt wird und daher in der Regel keine resistenzgerechte Therapie erfolgt. Nicht zuletzt muss natürlich auch daran gedacht werden, dass die Immunaktivierung nicht nur durch eine HIV-Infektion sondern auch durch andere Erkrankungen hervorgerufen werden kann. Diese müssen ausgeschlossen werden, um sicher zu gehen, dass die hohe Immunaktivierung tatsächlich auf die Infektion mit dem HI-Virus zurückzuführen ist.

Um all die genannten Ursachen für die weiterhin bestehende Immunaktivierung unter ART auszuschließen, sind weitere Untersuchungen (Resistenztestung der Viren, Testung auf Infektionen mit anderen Erregern) notwendig, die aus finanziellen und zeitlichen Gründen im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden konnten.

### **5.2.3 Hohe Immunaktivierung als Risikofaktor für HAND**

Ebenso wie eine chronische Immunaktivierung in der Peripherie als ursächlich für das Fortschreiten der HIV-Erkrankung bis ins AIDS-Stadium angesehen wird, nimmt man an, dass eine chronische Immunaktivierung im ZNS an der Entstehung von HAND beteiligt ist (Gannon et al., 2011). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob auch ein Zusammenhang zwischen der Höhe der Immunaktivierung in der Peripherie und dem Auftreten von neuropsychologischen Beeinträchtigungen besteht. Die Ergebnisse hierzu zeigen, dass sowohl höhere Konzentrationen des Immunaktivierungsmarkers suPAR als

auch des Immunaktivierungsmarkers human LBP in einigen neuropsychologischen Tests mit signifikant schlechteren Ergebnissen einhergehen (s. 4.7). Besonders die kognitiven Leistungen, weniger die motorische Performance, scheint mit höherer Immunaktivierung abzunehmen. Dieser Zusammenhang ist teilweise, aber nicht immer, bei den HIV-Patienten deutlicher zu sehen als bei der Kontrollgruppe. Aus dieser Beobachtung heraus, stellt sich die Frage, ob eine höhere Immunaktivierung, unabhängig von der HIV-Infektion, grundsätzlich mit einer schlechteren neurokognitiven Performance einhergeht. Allgemein kann man sagen, dass im Rahmen einer HIV-Infektion eine hohe Immunaktivierung in der Peripherie, und nicht nur im ZNS, einen Risikofaktor für die Entstehung von HAND darstellen könnte. Diese Beobachtung unterstützt das Ergebnis einer Studie, in der ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Plasma LPS-Konzentration mit erhöhter Monozyten Aktivität und dementiellen Symptomen festgestellt wurde. Demnach könne die Bakterien-Translokation im Gastrointestinaltrakt und die daraus resultierende erhöhte LPS- und LBP-Konzentration im Blut über eine Aktivierung von Monozyten, die wiederum in der HAND-Pathogenese eine Rolle spielen, eine Erklärung für diesen Zusammenhang darstellen (Ancuta et al., 2008). Insgesamt betrachtet, kann man für die HAND-Pathogenese annehmen, dass eine erhöhte Immunaktivierung in der Peripherie zu einer erhöhten Immunaktivierung im ZNS führt. Diese ist wiederum an der Entstehung von HAND beteiligt. Durch eine Bestimmung der peripheren Immunaktivierung könnte also das Risiko für die Entwicklung von HAND abgeschätzt werden. Folglich sollte bei Patienten mit erhöhter Immunaktivierung frühzeitig eine ART mit liquorgängigen Substanzen begonnen werden. Es gibt jedoch Studien, die zeigen, dass auch unter ART eine chronische Immunaktivierung im ZNS und somit auch HAND bestehen bleibt, obwohl die Viruslast zurückgeht (Edén et al., 2007). Daher sollte auch der Einsatz von Immunmodulierenden Substanzen im ZNS versucht werden, um die Immunaktivierung im ZNS zu reduzieren und somit in die Pathogenese von HAND einzugreifen.

### **5.3 DAT-Polymorphismus**

Ziel der Bestimmung des DAT-Polymorphismus war es, zu überprüfen, ob eine bestimmte Genvariante vermehrt mit dem Auftreten von HAND einhergeht als andere und somit

einen Risikofaktor für die Entwicklung von HAND darstellt (s. 4.3.2). Weiterhin sollte untersucht werden, ob Unterschiede zwischen den HIV-Patienten und den Kontrollpersonen in Hinblick auf das Auftreten der verschiedenen DAT-Genvarianten vorliegen (4.3.1). Ferner war auch die Untersuchung des Einflusses der verschiedenen DAT-Polymorphismen auf die Höhe der Immunaktivierung ein Schwerpunkt (s. 4.3.3).

### **5.3.1 HIV-Patienten und Kontrollpersonen weisen keine Unterschiede in der Verteilung der DAT-Polymorphismen auf**

Die am Häufigsten vorkommende Variante des DAT-Polymorphismus war sowohl bei den HIV-Patienten als auch bei den Kontrollpersonen das 10/10 Allel (42% bzw. 50%), gefolgt von dem 9/10 Allel (33% bzw. 27%) (s. 4.2). Dieses Ergebnis stimmt mit den Resultaten anderer Studien überein, in denen ebenfalls die Genvarianten 9/10 und 10/10 die überwiegende Mehrzahl ausmachen (Kang, Palmatier, & Kidd, 1999). Für Afrika ist auch das Auftreten der vielen weiteren Genvarianten in geringerer Anzahl nicht unbekannt (Horn et al., 2013) Diese machen die genetische Vielfalt in der Region deutlich.

Im Vergleich der HIV-Patienten mit den Kontrollpersonen ließen sich keine signifikanten Unterschiede in Hinblick auf die Häufigkeit des Auftretens der verschiedenen DAT-Polymorphismen feststellen (s. 4.2). Die Beobachtung von Horn et al., dass bei HIV-Patienten das 10/10 Allel häufiger vorkommt als bei nicht infizierten Kontrollpersonen und womöglich einen Risikofaktor für die Infektion mit dem HI-Virus darstellt, kann daher nicht bestätigt werden (s. 1.4.1). Möglich ist aber auch, dass zu wenige Personen in die Untersuchung dieser Arbeit eingingen, weshalb eine weitere Studie mit einer größeren Anzahl an Probanden sinnvoll wäre. Möglicherweise ist aber auch die Korrelation zwischen dem DAT 10/10-Phänotyp und einer erhöhten Infektionswahrscheinlichkeit mit HIV abhängig vom untersuchten Patientenkollektiv. Während Horn et al. Patienten aus Südafrika und Deutschland untersucht haben, wurden in der vorliegenden Arbeit Patienten aus Tanzania analysiert. Diese Gruppen unterschieden sich hinsichtlich ihrer ethnischen Zugehörigkeit, des vorherrschenden Virus-Subtyps und auch möglicherweise hinsichtlich der Haupt-Transmissionsroute (vaginal oder anal).

### **5.3.2 DAT-Polymorphismus hat keinen Einfluss auf die Entwicklung von HAND**

Die Korrelation der verschiedenen Varianten des DAT-Polymorphismus mit den Ergebnissen der neuropsychologischen Tests ergab keine signifikanten Zusammenhänge. Auch ein Trend, dass ein bestimmter DAT-Polymorphismus mit einer stärkeren neurokognitiven Beeinträchtigung einhergeht, besteht nicht. Somit ist davon auszugehen, dass der DAT-Polymorphismus keinen Einfluss auf die Entwicklung von HAND hat und somit auch keinen Risikofaktor hierfür darstellt.

Die Tatsache, dass in dem Gehirngewebe von HIV-Patienten mit HIV-Demenz nach dem Tod eine niedrigere Menge an DAT nachgewiesen wurde als in dem Gehirngewebe von HIV-Patienten ohne HIV-Demenz (Wang et al., 2004), führt zu der Überlegung, dass der DAT-Polymorphismus 9/10, der nachgewiesener Maßen mit einer niedrigeren DAT-Expression einhergeht (Fuke et al., 2001; Heinz et al., 2000), bei Patienten mit neurokognitiver Beeinträchtigung häufiger vorkommen könnte. Diese Idee kann mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht unterstützt werden. Wohlmöglich ist aber auch die niedrige DAT-Konzentration in dem Gehirngewebe der HIV-Demenz-Patienten nicht genetisch bedingt, sondern Folge der ZNS-Infektion mit dem HI-Virus. Demnach könnte die niedrige DAT-Konzentration unabhängig davon, welche Variante des DAT-Polymorphismus vorliegt, in dem Gehirngewebe von betroffenen Patienten nachgewiesen werden.

Des Weiteren zeigt eine Studie, dass das 10/10 Allel mit einer höheren Dopamin-Konzentration im Liquor korreliert und häufiger mit neurokognitiven Symptomen assoziiert zu sein scheint (Horn et al., 2013). Aber auch diese Beobachtung stimmt nicht mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit überein.

Insgesamt liefern die Resultate dieser Arbeit keinen Anhaltspunkt, dass der DAT-Polymorphismus einen Einfluss auf die Pathogenese von HAND hat.

### **5.3.3 DAT-Polymorphismus hat keinen Einfluss auf die Höhe der Immunaktivierung**

Es konnte kein Zusammenhang zwischen den Varianten des DAT-Polymorphismus und der Immunaktivierung festgestellt werden (s. 4.8). Keine der Genvarianten scheint eine Auswirkung auf die Höhe der Immunaktivierung zu haben. Da die Immunaktivierung

maßgeblich für das Voranschreiten der HIV-Erkrankung bis in das AIDS-Stadium verantwortlich ist (Ostrowski, 2010), scheint der DAT-Polymorphismus somit keinen Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung zu haben.

## 6. Zusammenfassung

Im Rahmen einer HIV-Infektion treten bei etwa der Hälfte aller Infizierten im Verlauf der Erkrankung neurokognitive Störungen auf. Zwar ist seit der Einführung der ART die Prävalenz der schweren HIV-Demenz zurückgegangen, aber vor allem mildere Formen sprechen nicht zufriedenstellend auf diese Therapie an und spielen auf Grund der insgesamt verbesserten Lebenserwartung von HIV-Patienten eine immer größere werdende Rolle. Um eine wirksame Therapie gegen HAND entwickeln zu können, sind detaillierte Kenntnisse über die Pathogenese und die Identifizierung von Risikofaktoren notwendig. In der vorliegenden Arbeit sollten daher drei unterschiedliche Faktoren auf ihren Zusammenhang mit HAND überprüft werden: der HIV-Protease Subtyp, die Höhe der Immunaktivierung und der DAT-Polymorphismus.

Hierfür standen Blut- und Plasmaproben von 112 HIV-Patienten und 30 Kontrollpersonen aus Tansania zur Verfügung, bei denen zuvor im Rahmen einer anderen medizinischen Doktorarbeit verschiedene neuropsychologische Tests durchgeführt worden waren. Zur Bestimmung des HIV-Protease Subtyps wurde die Virus-RNA aus dem Patienten-Plasma isoliert, in DNA umgeschrieben, gereinigt und anschließend sequenziert. Die Sequenz wurde mit Hilfe der Stanford University Database in Hinblick auf den HIV-Subtyp analysiert. Die Höhe der Immunaktivierung wurde durch Konzentrationsbestimmung der Immunaktivierungsmarker suPAR und human LBP mittels ELISA erfasst. Die Bestimmung des DAT-Polymorphismus erfolgte durch Isolation der Patienten-DNA aus den Blutproben, nachfolgender PCR und anschließender Agarosegelelektrophorese.

Die Untersuchung dieser drei Faktoren auf ihren Zusammenhang mit der neuropsychologischen Performance ergaben folgende Ergebnisse: 1. Der HIV-Protease Subtyp A und rekombinante Formen, die Subtyp A enthalten, gehen mit signifikant schlechteren Testergebnissen einher als die anderen HIV-Protease Subtypen. 2. Eine höhere Immunaktivierung korreliert ebenfalls mit schlechteren Testergebnissen. 3. Der DAT-Polymorphismus zeigt keine signifikanten Zusammenhänge mit HAND. Des Weiteren geht der HIV-Protease Subtyp C mit einer niedrigeren Immunaktivierung einher als die anderen Subtypen.

Diese Beobachtungen führen zu der Überlegung, dass der HIV-Protease Subtyp A sowie eine hohe periphere Immunaktivierung Risikofaktoren für die Entwicklung von HAND

darstellen könnten und eventuell für die Pathogenese von Bedeutung sind. Der DAT-Polymorphismus scheint hierbei hingegen keine Rolle zu spielen. Bei dem Vorliegen des Subtyps A bzw. einer hohen Immunaktivierung sollte demnach über einen früheren Zeitpunkt für den Therapiebeginn mit ART nachgedacht werden, um die Entstehung von HAND zu verzögern oder sogar zu verhindern. Auf Grund der hohen Immunaktivierung als Risikofaktor für neuropsychologische Beeinträchtigungen sollte auch der Einsatz von immunmodulierenden Substanzen diskutiert werden. Die niedrigere Immunaktivierung, die bei einer Infektion mit dem HIV-Protease Subtyp C nachgewiesen werden konnte, könnte ein Hinweis auf eine niedrigere Pathogenität infolge einer Anpassung dieses Subtyps an den Menschen sein.

Da es sich bei all den durchgeführten Untersuchungen um Post-hoc-Analysen handelt, sind dringend weitere Studien zur Überprüfung der gefundenen Zusammenhänge notwendig.

## Literaturverzeichnis

- Ancuta, P., Kamat, A., Kunstman, K. J., Kim, E.-Y., Autissier, P., Wurcel, A., ... Gabuzda, D. (2008). Microbial translocation is associated with increased monocyte activation and dementia in AIDS patients. *PloS One*, 3(6), e2516.
- Antinori, A., Arendt, G., Becker, J. T., Brew, B. J., Byrd, D. A., Cherner, M., ... Wojna, V. E. (2007). Updated research nosology for HIV-associated neurocognitive disorders. *Neurology*, 69(18), 1789–1799.
- Barré-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., ... Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 220(4599), 868–871. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15378805>
- Boivin, M. J., Ruel, T. D., Boal, H. E., Bangirana, P., & Cao, H. (2010). HIV-subtype A is associated with poorer neuropsychological performance compared to subtype D in ART-naïve Ugandan children. *AIDS*, 24(8), 1163–1170.
- Carr, J. K., Salminen, M. O., Koch, C., Gotte, D., Artenstein, a W., Hegerich, P. a, ... McCutchan, F. E. (1996). Full-Length Sequence and Mosaic Structure of a Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolate from Thailand. *Journal of Virology*, 70(9), 5935–5943.
- Centers for Disease Control and Prevention. (1992). 1993 Revised Classification System for HIV Infection and Expanded Surveillance Case Definition for AIDS Among Adolescents and Adults. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 41(51), 961–962.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (1981). Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men-New York City and California. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 30, 305–308.
- Chun, T. W., Davey, R. T. J., Ostrowski, M., Shawn Justement, J., Engel, D., Mullins, J. I., & Fauci, A. S. (2000). Relationship between pre-existing viral reservoirs and the re-emergence of plasma viremia after discontinuation of highly active anti-retroviral therapy. *Nat Med*, 6(7), 757–761.
- Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, F., Chamaret, S., Rey, M. A., Santos-Ferreira, M. O., ... al. et. (1986). Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science*, 233(4761), 343–346.
- DAIG. (2014). Deutsch-Österreichische Leitlinien zur antiretroviralen Therapie der HIV-Infektion, 1–50.

- Dean, M., Carrington, M., Winkler, C., Huttley, G., Smith, M., Allikmets, R., ... O'Brien, S. (1996). Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the ckr5 structural gene. Hemophilia growth and development study, Multicenter AIDS cohort study, Multicenter hemophilia cohort study, San Francisco city cohort, ALIVE. *Science*, *273*, 1856–1862.
- Dore, G. J., Correll, P. K., Li, Y., Kaldor, J. M., Cooper, D. A., & Brew, B. J. (1999). Changes to AIDS dementia complex in the era of highly active antiretroviral therapy. *AIDS*, *13*(10), 1249–1253.
- Dore, G. J., McDonald, A., Li, Y., Kaldor, J. M., & Brew, B. J. (2003). Marked improvement in survival following AIDS dementia complex in the era of HAART. *AIDS*, *17*(10), 1539–1545.
- Edén, A., Price, R. W., Spudich, S., Fuchs, D., Hagberg, L., & Gisslén, M. (2007). Immune activation of the central nervous system is still present after >4 years of effective highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis*, *196*(12), 1779–1783.
- Eggers, C. C., van Lunzen, J., Buhk, T., & Stellbrink, H. (1999). HIV Infection of the Central Nervous System Is Characterized by Rapid Turnover of Viral RNA in Cerebrospinal Fluid. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, *20*, 259–264.
- Eggers, C., & Rosenkranz, T. (2014). *Hiv 2013/2014*. (C. Hoffmann & J. K. Rockstroh, Eds.) (pp. 694–702). Medizin Fokus Verlag.
- Eigen, M. (1993). Viral quasispecies, *269*, 42–49.
- Ellis, R. J., Badiee, J., Vaida, F., Letendre, S., Heaton, R. K., Clifford, D., ... Grant, I. (2011). CD4 nadir is a predictor of HIV neurocognitive impairment in the era of combination antiretroviral therapy. *AIDS*, *25*(14), 1–8.  
doi:10.1097/QAD.0b013e32834a40cd.CD4
- Faria, N. R., Rambaut, A., Suchard, M. A., Baele, G., Bedford, T., Ward, M. J., ... Lemey, P. (2014). The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. *Science*, *346*, 56–61.
- Finzi, D., Blankson, J., Siliciano, J. D., Margolick, J. B., Chadwick, K., Pierson, T., ... Siliciano, R. F. (1999). Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med*, *5*(5), 512–517.
- Folstein, M. F., Folstein, S. E., & McHugh, P. R. (1975). “Mini-Mental State” A Practical Method for Grading the Cognitive State of Patients for the Clinician. *J Psychiatr Res*, *12*, 189–198.
- Fuke, S., Suo, S., Takahashi, N., Koike, H., Sasagawa, N., & Ishiura, S. (2001). The VNTR polymorphism of the human dopamine transporter (DAT1) gene affects gene expression. *The Pharmacogenomics Journal*, *1*(2), 152–156.

- Gallo, R., Salahuddin, S., Popovic, M., Shearer, G., Kaplan, M., Haynes, B., ... Et, A. (1984). Frequent Detection and Isolation of Cytopathic Retroviruses (HTLV-111) from Patients with AIDS and at Risk for AIDS. *Science*, 224(4648), 500–503.
- Gannon, P., Khan, M. Z., & Kolson, D. L. (2011). Current understanding of HIV-associated neurocognitive disorders pathogenesis. *Curr Opin Neurol*, 24(3), 275–283.
- Gao, F., Robertson, D. L., Carruthers, C. D., Li, Y., Bailes, E., Kostrikis, L. G., ... Hahn, B. H. (1998). An Isolate of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Originally Classified as Subtype I Represents a Complex Mosaic Comprising Three Different Group M Subtypes (A, G, and I). *Journal of Virology*, 72(12), 10234–10241.
- Gladsjo, J. A., Schuman, C. C., Evans, J. D., Peavy, G. M., Miller, S. W., & Heaton, R. K. (1999). Norms for Letter and Category Fluency: Demographic Corrections for Age, Education, and Ethnicity. *Assesment*, 6, 147–178.
- Gottlieb, M. S., Schroff, R., Schanker, H. M., Weisman, J. D., Fan, P. T., Wolf, R. A., ... A. (1981). Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med*, 305, 1425–1431.
- Greenwood, T. A., Alexander, M., Keck, P. E., McElroy, S., Sadovnick, A. D., Remick, R. A., & Kelose, J. R. (2001). Evidence for linkage disequilibrium between dopamin transporter and bipolar disorder. *Am J Med Genet*, 105, 145–151.
- Group, M. E. W. (2013). Assessment, diagnosis, and treatment of HIV-associated neurocognitive disorder: a consensus report of the mind exchange program. *Clin Infect Dis*, 56(7), 1004–1017.
- Gulick, R. M., Meibohm, A., Havlir, D., Eron, J., Mosley, A., Chodakewitz, J. A., ... Mellors, J. (2003). Six-year follow-up of HIV-infected adults in a clinical trial of antiretroviral therapy with indinavir, zidovudine and lamivudine. *AIDS*, 17, 2345–2349.
- Hahn, H., Kaufmann, S. H. E., Schulz, T. F., & Suerbaum, S. (2008). *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie* (6th ed., pp. 520–535). Springer Medizin Verlag.
- Heaton, R. K., Clifford, D. B., Franklin, D. R., Woods, S. P., Ake, C., Vaida, F., ... Grant, I. (2010). HIV-associated neurocognitive disorders persist in the era of potent antiretroviral therapy: CHARTER Study. *Neurology*, 75(23), 2087–96.
- Heaton, R. K., Franklin, D. R., Ellis, R. J., McCutchan, J. A., Letendre, S. L., Leblanc, S., ... Grant, I. (2011). HIV-associated neurocognitive disorders before and during the era of combination antiretroviral therapy: differences in rates, nature, and predictors. *J Neuroviol*, 17(1), 3–16.

- Heinz, A., Goldman, D., Jones, D., Palmour, R., Hommer, D., Gorey, J., ... Weinberger, D. (2000). Genotype influences in vivo dopamine transporter availability in human striatum. *Neuropsychopharmacology*, 22(2), 133–139.
- Hemelaar, J., Gouws, E., Ghys, P. D., & Osmanov, S. (2006). Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *AIDS (London, England)*, 20(16), W13–23.
- Herbinger, K.-H., Gerhardt, M., Piyasirisilp, S., Mloka, D., Arroyo, M. a, Hoffmann, O., ... Hoelscher, M. (2006). Frequency of HIV type 1 dual infection and HIV diversity: analysis of low- and high-risk populations in Mbeya Region, Tanzania. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 22(7), 599–606.
- Herold, G. (2013). *Innere Medizin* (pp. 889–898).
- Horn, A., Scheller, C., du Plessis, S., Arendt, G., Nolting, T., Joska, J., ... Koutsilieri, E. (2013). Increases in CSF dopamine in HIV patients are due to the dopamine transporter 10/10-repeat allele which is more frequent in HIV-infected individuals. *Journal of Neural Transmission*, 120(10), 1411–1419.
- Jayadev, S., & Garden, G. A. (2009). Host and Viral Factors Influencing the Pathogenesis of HIV Associated Neurocognitive Disorders. *J Neuroimmune Pharmacol*, 4(2), 175–189.
- Jetzt, A. E., Yu, H., Klarmann, G. J., Ron, Y., Preston, B. D., & Dougherty, J. P. (2000). High rate of recombination throughout the human immunodeficiency virus type 1 genome. *J Virol*, 74(3), 1234–1240.
- Kang, A., Palmatier, M., & Kidd, K. (1999). Global variation of a 40-bp VNTR in the 3'-untranslated region of the dopamine transporter gene (SLC6A3). *Biol Psychiatry*, 46(2), 151–160.
- Kasang, C., Ulmer, A., Donhauser, N., Schmidt, B., Stich, A., Klinker, H., ... Scheller, C. (2012). HIV patients treated with low-dose prednisolone exhibit lower immune activation than untreated patients. *BMC Infectious Diseases*, 12(1), 14. doi:10.1186/1471-2334-12-14
- Kayser, F. H., Böttger, E. C., Zinkernagel, R. M., Haller, O., Eckert, J., & Deplazes, P. (2010). *Medizinische Mikrobiologie* (12th ed., pp. 538–550). Thieme.
- Kersting, L. (2015). *Prävalenz HIV-assoziiierter neurokognitiver Störungen unter Patienten einer HIV-Ambulanz eines Referenzkrankenhauses in Tansania*.
- Klatt, N. R., Funderburg, N. T., & Brenchley, J. M. (2013). Microbial translocation, immune activation and HIV disease. *Trends Microbiol*, 21(1), 6–13.

- Laasonen-Balk, T., Kuikka, J., Viinamäki, H., Husso-Saastamoinen, M Lehtonen, J., & Tiihonen, J. (1999). Striatal dopamine transporter density in major depression. *Psychopharmacology (Berl.)*, *144*, 282–285.
- Löffler, G., Petrides, P. E., & Heinrich, P. C. (2007). *Biochemie & Pathobiochemie* (p. 337).
- Maldonado, C. C., Bentley, A. J., & Mitchell, D. (2004). A pictorial sleepiness scale based on cartoon faces. *Sleep*, *27*(3), 541–8.
- Manches, O., & Bhardwaj, N. (2009). Resolution of immune activation defines nonpathogenic SIV infection. *J Clin Invest*, *119*(12), 3512–3515.
- Masur, H., Michelis, M. A., Greene, J. B., Onorato, I., Stouwe, R. A., Holzman, R. S., ... Cunningham-Rundles, S. (1981). An outbreak of community-acquired Pneumocystis carinii pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. *N Engl J Med*, *305*, 1431–1438.
- McArthur, J. C. (2004). HIV dementia: an evolving disease. *J Neuroimmunol*, *157*, 3–10.
- Njai, H. F., Ewings, F. M., Lyimo, E., Foulongne, V., Ngerageza, D., Mongi, A., ... Kapiga, S. H. (2013). Deciphering the Complex Distribution of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtypes among Different Cohorts in Northern Tanzania. *PloS One*, *8*(12), e81848.
- Nyamweya, S., Hegedus, A., Jaye, A., Rowland-Jones, S., Flanagan, K. L., & Macallan, D. C. (2013). Comparing HIV-1 and HIV-2 infection: Lessons for viral immunopathogenesis. *Rev Med Virol*, *23*(4), 221–240.
- Nyombi, B. M., Kristiansen, K. I., Bjune, G., Müller, F., & Holm-Hansen, C. (2008). Diversity of human immunodeficiency virus type 1 subtypes in Kagera and Kilimanjaro regions, Tanzania. *AIDS Res Hum Retroviruses*, *24*(6), 761–769.
- Ostrowski, S. R. (2010). Immune activation in chronic HIV infection. *Dan Med Bull*, *57*(3), B4122.
- Rao, V. R., Sas, A. R., Eugenin, E. A., Siddappa, N. B., Bimonte-nelson, H., Berman, J. W., ... Prasad, V. R. (2008). HIV-1 clade-specific differences in the induction of neuropathogenesis. *J Neurosci*, *28*(40), 10010–10016.
- Richardson, J. (2007). Measures of short-term memory: a historical review. *Cortex*, *43*, 635–650.
- Robertson, D. L., Anderson, J. P., Bradac, J. a, Carr, J. K., Foley, B., Funkhouser, R. K., ... Korber, B. (2000). HIV-1 Nomenclature Proposal. *Science*, *288*(5463), 55–6.

- Sacktor, N. C., Wong, M., Nakasujja, N., Richard, L., Selnes, O. A., Musisi, S., ... Katabira, E. (2005). The International HIV Dementia Scale : a new rapid screening test for HIV dementia. *AIDS*, *19*, 1367–1374.
- Sacktor, N., Mc Dermott, M. P., Marder, K., Schifitto, G., Selnes, O. A., McArthur, J. C., ... Epstein, L. (2002). HIV-associated cognitive impairment before and after the advent of combination therapy. *J Neuroviol*, *8*, 136–142.
- Sacktor, N., Nakasujja, N., Skolasky, R. L., Rezapour, M., Musisi, S., Katabira, E., ... Quinn, T. C. (2009). HIV Subtype D Is Associated with Dementia, Compared with Subtype A, in Immunosuppressed Individuals at Risk of Cognitive Impairment in Kampala, Uganda. *Clin Infect Dis*, *49*(5), 780–786.
- Sharp, P. M., Bailes, E., Robertson, D. L., Gao, F., & Hahn, B. H. (1999). Origins and Evolution of AIDS Viruses. *Biol Bull*, *196*, 338–342.
- Spudich, S., & Gonzalez-Scarano, F. (2012). HIV-1-Related Central Nervous System Disease: Current Issues in Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. *Cold Spring Harb Perspect Med*, *2*(6), a007120.
- Stürmer, M., Doerr, H. W., Berger, A., & Gute, P. (2008). Is transmission of HIV-1 in non-viraemic serodiscordant couples possible ? *Antivir Ther*, *13*, 729–732.
- The Antiretroviral Therapie Cohort Collaboration. (2008). Life expectancy of individuals on combination antiretroviral therapy in high-income countries: a collaborative analysis of 14 cohort studies. *Lancet*, *372*(9635), 293–299.
- Thunø, M., Macho, B., & Eugen-Olsen, J. (2009). suPAR: the molecular crystal ball. *Disease Markers*, *27*(3), 157–72.
- Ueno, S., Nakamura, M., Mikami, M., Kondoh, K., Ishiguro, H., Arinami, T., ... Tanabe, H. (1999). Identification of a novel polymorphism of the human dopamine transporter (DAT1) gene and the significant association with alcoholism. *Mol Psychiatr*, *4*, 552–557.
- UNAIDS. (2013). *Report on the global AIDS epidemic 2013*.
- Vandenbergh, D. J., Perslco, A. M., Hawkins, A. L., Griffin, C. A., Li, X., Jabs, E. W., & Uhl, G. R. (1992). Human Dopamine Transporter Gene ( DAT1 ) Maps to Chromosome 5p15.3 and Displays a VNTR. *Genomics*, *14*, 1104–1106.
- Vanhems, P., & Beaulieu, R. (1997). HIV medicine Primary infection by type 1 human immunodeficiency virus : diagnosis and prognosis. *Postgrad Med J*, *73*, 403–408.
- Vivithanaporn, P., Heo, G., Gamble, J., Krentz, H. B., Hoke, A., Gill, M. J., & Power, C. (2010). Neurologic disease burden in treated HIV / AIDS predicts survival. *Neurology*, *75*(13), 1150–1158.

Wang, G.-J., Chang, L., Volkow, N. D., Telang, F., Logan, J., Ernst, T., & Fowler, J. S. (2004). Decreased brain dopaminergic transporters in HIV-associated dementia patients. *Brain*, *127*(Pt 11), 2452–2458.

Wilson, D., Law, M., Grulich, A., Cooper, D., & Kaldor, J. (2008). Relation between HIV viral load and infectiousness: a model-based analysis. *Lancet*, *372*, 314–320.

Wyatt, R., & Sodroski, J. (1998). The HIV-1 Envelope Glycoproteins: Fusogens, Antigens, and Immunogens. *Science*, *280*(5371), 1884–1888.  
doi:10.1126/science.280.5371.1884

Yang, B., Chan, R. C., Jing, J., Li, T., Sham, P., & Chen, R. Y. (2007). A meta-analysis of association studies between the 10-repeat allele of a VNTR polymorphism in the 3'-UTR of dopamine transporter gene and attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, *144B*, 541–550.

## **Danksagung**

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. rer. nat. Carsten Scheller für die Überlassung des Themas, die hervorragende Betreuung meiner Arbeit, die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die ständige Hilfsbereitschaft bei allen thematischen Fragen und während der experimentellen Phase sowie für die Übernahme des Erstgutachtens danken.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau Prof. Dr. Eleni Koutsilieri für die wissenschaftlichen Diskussionen, Anregungen und Hilfestellungen während der Arbeit.

Mein Dank für die gute Zusammenarbeit im Labor und die angenehme Atmosphäre geht an die Arbeitsgruppen Scheller und Koutsilieri, insbesondere an Anne Horn und Eva Gschmack für die Einführung in die Laborarbeit und die vielfältigen Unterstützungen während der experimentellen Phase.

Nicht zuletzt bedanke ich mich von ganzem Herzen bei meiner Familie, die mir mein Studium ermöglichte und mir immer mit viel Interesse und Verständnis zur Seite stand. Auch möchte ich mich bei meinem Freund Rasmus bedanken, der mich während der Arbeit stets motivierte und in jeglicher Hinsicht unterstützte.

## **Lebenslauf**

### Persönliche Daten

Name: Katja Engels

### Schulbildung

1997 – 2001 Grundschule am Heideweg, Kassel

2001 – 2009 Wilhelmsgymnasium, Kassel

2009 Abitur

### Hochschulausbildung

2009 – 2015 Studiums der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

2011 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2014 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2014 – 2015 Praktisches Jahr an dem Universitätsklinikum Würzburg:  
Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie  
Zentrum Innere Medizin  
Zentrum operative Medizin

2015 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### Promotion

2012 - 2015 Dissertation am Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg bei Prof. Dr. rer. nat. C. Scheller:  
„Virologische und Immunologische Korrelate mit HAND bei HIV- Patienten aus Tansania“

Würzburg, 26.11.2015