

Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie
der Universität Würzburg
Lehrstuhlinhaber: Professor Dr. med. Lars Dölken

Untersuchung der Rolle von GFAP-Autoantikörpern bei der Pathogenese von
HIV-assoziierten neurologischen Erkrankungen

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg vorgelegt von

Raja Idris
Geb. in Witten

Würzburg, Dezember 2022



Referent / Referentin:

Prof. Dr. Carsten Scheller

Korreferent / Korreferentin:

Prof. Dr. Thomas Dandekar

Dekan:

Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

Die Promovendin ist Ärztin.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die Promotionsschrift „Untersuchung der Rolle von GFAP-Autoantikörpern bei der Pathogenese von HIV-assoziierten neurologischen Erkrankungen“ eigenständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen genutzt habe.

Ich versichere außerdem, dass diese Dissertationsschrift weder durch eine kommerzielle Vermittlung zustande gekommen ist, noch in gleicher oder ähnlicher Form bereits vorgelegt worden ist, um einen akademischen Grad zu erlangen. Die Regeln der Universität Würzburg über gute wissenschaftliche Praxis wurden eingehalten.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 HIV	1
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Klassifizierung	2
1.1.3 Aufbau	3
1.1.4 Replikationszyklus.....	4
1.1.5 Transmission	5
1.1.6 Histopathologie	7
1.1.7 Klinik.....	8
1.1.1 Therapie und Prävention	10
1.2 HIV und das zentrale Nervensystem	12
1.2.1 Infektion des ZNS.....	12
1.2.2 Histopathologie	12
1.2.3 Opportunistische Infektionen des ZNS	13
1.2.4 Klassifikation von HAND	13
1.2.5 Therapie	14
1.3 Das saure Gliafaserprotein (GFAP).....	14
1.3.1 Vorkommen	14
1.3.2 Pathogenese	15
1.3.3 Autoimmunität	16
1.4 Zielsetzung	16
2. Material	17
2.1 Geräte	17
2.2 Glas	18
2.3 Kunststoff	18
2.4 Chemikalien.....	19
2.5 Puffer.....	19
2.6 Antikörper und Enzyme	20
2.7 Größenstandards	20
2.8 Programme.....	20
2.9 Sonstiges.....	21

Inhaltsverzeichnis

3. Methoden	22
3.1 Gehirnhomogenate	22
3.1.1 Gewebe	22
3.1.2 Homogenisierung	24
3.2 SDS-Gelelektrophorese	24
3.3 Western-Blot mittels tankblot-Verfahren	26
3.3.1 Proteintransfer	26
3.3.2 Blocken und Fixieren	27
3.3.3 Immunfärbung	27
3.3.4 Farbkubation und Quantifizierung	27
3.3.5 Auswertung der Signalintensität	28
3.3.6 Bestimmung der Banden	29
3.3.7 Übersicht der erstellten Western Blots	29
3.4 HAND-1 Studie	30
3.5 Neurokognitive Tests	31
3.5.1 Mini Mental State Examination (MMSE)	31
3.5.2 Internationale HIV Demenz Skala (IHDS)	32
3.5.3 Verbal Fluency Test	33
3.5.4 Digit Span Test	33
3.5.5 Pegboard Test	33
3.5.6 Trail Making Test (TMT)	34
3.5.7 International Activities of Daily Life (IADL)	35
3.6 Statistische Datenanalyse	35
4. Ergebnisse	37
4.1 Epidemiologische Merkmale der Studienteilnehmenden	37
4.2 Auswertung der Western Blots	38
4.2.1 Signifikante Unterschiede in der GFAP-Antikörper Signalintensität der verschiedenen Gehirnareale	41
4.2.2 Keine signifikanten Unterschiede der GFAP-Antikörper Signalintensität von PLWH und Kontrollen	44
4.3 Korrelation der neurokognitiven Tests mit den GFAP-Antikörper Signalintensitäten	48

Inhaltsverzeichnis

4.3.1	Studiengruppe 1 (HIV/HAART)	48
4.3.1.1	IHDS	49
4.3.1.2	Mini Mental State Untersuchung	50
4.3.1.3	Trail Making Test	52
4.3.1.4	Verbal Fluency Task, Digit Span Test und Pegboard Test	54
4.3.2	Studiengruppe 2 (Kontrollen)	54
4.4	Korrelation der Anti-GFAP Signale mit den CD4+-Zellzahlen der HIV-positiven Teilnehmenden	55
5.	Diskussion	57
5.1	GFAP Signalintensitäten der Studiengruppen	57
5.2	GFAP Signalintensitäten der Gehirnareale	58
5.3	Die Rolle von GFAP und GFAP-Autoantikörpern in der Pathogenese von HAND	59
5.3.1	Entstehung und Folgen der GFAP-Aggregation	60
5.3.2	GFAP und zelluläre Stressreaktionen	61
5.3.3	Entstehung der GFAP-Autoantikörper	62
5.3.4	Folgen der GFAP-Autoantikörper	63
5.4	GFAP-Autoantikörper als Marker für neurokognitive Defizite bei PLWH	65
5.5	Methodische Analyse	66
6.	Zusammenfassung	68
7.	Abstract	69
8.	Literaturverzeichnis	70
I.	Abkürzungsverzeichnis	
II.	Abbildungsverzeichnis	
III.	Tabellenverzeichnis	
IV.	Danksagung	
V.	Lebenslauf	

1. Einleitung

1.1 HIV

Das erworbene Immunschwächesyndrom (acquired immune deficiency syndrome, AIDS) und sein Auslöser, das Humane Immundefizienz-Virus (HIV), zählen zu den größten Herausforderungen für die Globale Gesundheit. Die erste Beschreibung von Patienten mit AIDS in der medizinischen Literatur stammt aus dem Jahr 1981 (1). Von Oktober 1980 bis Mai 1981 verzeichnete die amerikanische Gesundheitsbehörde CDC eine ungewöhnliche Häufung an Fällen von *Pneumocystis jirovecii*-Pneumonie unter jungen Männern in Los Angeles (2). In der kurzen Meldung wird eine „cellular-immune dysfunction“ bei den Männern vermutet (2). Ein Jahr später berichtet die CDC, dass im selben Cluster auch das Kaposi-Sarkom überdurchschnittlich häufig auftritt (3). Im September 1982 wurde dann eine offizielle Falldefinition für AIDS veröffentlicht (4). Die Forscher warnten davor, dass die Mortalität deutlich über den angegebenen 41 % liegen könne und dass die Inzidenz stark ansteige (4). 1983 berichtete das Team um Dr. Françoise Barré-Sinoussi vom französischen Pasteur Institut in einem Artikel in der Zeitschrift *Science*, dass sie bei einem Patienten, der wahrscheinlich an AIDS erkrankt war, ein Retrovirus isoliert hätten (5). Für die Entdeckung des später HIV genannten Virus, wurde ihr und ihrem Kollegen Dr. Luc Montagnier im Jahr 2008 der Nobelpreis für Medizin und Physiologie verliehen (6).

1.1.1 Epidemiologie

Seit dieser ersten Beschreibung von AIDS hat HIV 32 Millionen Menschen das Leben gekostet (7). Inzwischen wurden große Fortschritte in der Therapie und Prävention von HIV gemacht. Im Jahr 2018 war die Zahl der AIDS-assoziierten Todesfälle im Vergleich zum Jahr 2000 um 45 % geringer, die Inzidenz ist ebenfalls um 37 % gesunken (7). Dennoch ist die Epidemie nicht unter Kontrolle, 2018 starben 770 000 Menschen an AIDS-assoziierten Erkrankungen und es kam zu 1,7 Millionen Neuinfektionen (7). Die größte Krankheitslast trägt der afrikanische Kontinent, dort leben 25,7 Millionen der insgesamt 37,9 Millionen HIV-positiven Menschen. Um diese Epidemie zu beenden hat sich die UN-

Einleitung

Staatengemeinschaft mit ihrem gemeinsamen Programm für HIV/AIDS (Joint United Nations Programme on HIV/AIDS, UNAIDS) das „90-90-90-Ziel“ gesetzt: 90 % der an HIV-Erkrankten sollen ihren Status kennen, 90 % von ihnen sollen eine antiretrovirale Therapie bekommen und 90 % der Therapierten sollen eine Viruslast unter der Nachweisgrenze aufweisen. In Deutschland werden laut Robert-Koch-Institut die beiden letzten Ziele erreicht, im Jahr 2017 kannten jedoch lediglich 87 % der HIV-positiven ihren Status (8). Weltweit erhalten 62 % aller Infizierten eine antiretrovirale Therapie (9).

1.1.2 Klassifizierung

HIV gehört zur Familie der Retroviren, man unterscheidet HIV-1 von HIV-2. Beide stammen von SI-Viren (simian immunodeficiency virus, SIV) ab, die unterschiedliche Affenspezies befallen. HIV-2 ist weitestgehend auf Westafrika beschränkt, während sich HIV-1 weltweit verbreitet hat. HIV-2 gilt als weniger virulent, die Transmissionsraten sind geringer und die Patienten sind länger asymptomatisch als Patienten mit HIV-1 (10). Der Fokus dieser Arbeit liegt auf HIV-1. Im weiteren Verlauf ist, wenn nicht anders gekennzeichnet, HIV-1 gemeint wo immer HIV steht.

HIV-1 kann anhand von Unterschieden in der Genomsequenz in Gruppen eingeteilt werden (11). Bis dato wurden die Gruppen M (major), O (outlier), N (non-major oder new) und P definiert (12). Der Klassifizierungsprozess ist dynamisch und unterliegt daher stetigem Wandel (13). Man geht davon aus, dass diese Gruppen durch unabhängige Übertragungen des SI-Virus von verschiedenen Primaten auf den Menschen entstanden sind (12).

Wie in der Übersichtsarbeit von Bum Sik Chin erwähnt, wurde die globale HIV-Epidemie durch HI-Viren der Gruppe M verursacht (14). Diese Gruppe weist neun Untertypen auf: A, B, C, D, F, G, H, J und K (13). In Westeuropa, Nordamerika und Australien überwiegt der Subtyp B, weltweit dominiert allerdings der Subtyp C (14). Viren der anderen Gruppen (N, O, P) wurden hauptsächlich aus Proben von Patienten aus Kamerun oder benachbarten Regionen isoliert (12). Es gibt sporadische Fälle von HIV-O aus Nordamerika, Westeuropa und Afrika (12). HIV-N wurde bei 14 Patienten aus Kamerun und einem Patienten aus Togo isoliert und es sind bisher nur zwei Infektionen mit HIV-P bekannt, beide Patienten

Einleitung

stammen ebenfalls aus Kamerun (12). Diese Zahlen legen nahe, dass alle HIV-1 -Varianten ihren Ursprung in Kamerun und den Ländern des Kongobeckens haben (12).

Bei einer Infektionen mit verschiedenen HIV-Stämmen zur gleichen Zeit können Rekombinanten entstehen (15). Diese Formen von HIV können sich verbreiten und werden dann als CRF (circulating recombinant form) bezeichnet (14). Außerdem weist das Virus eine extrem hohe Rate an Spontanmutationen auf (16). Diese genetische Variabilität ist ein Erfolgsfaktor für das Virus: es kommt zu Medikamentenresistenzen, die Entwicklung von Impfungen wird verkompliziert und die weltweite Verbreitung begünstigt (16).

1.1.3 Aufbau

Das Genom des HI-Virus besteht aus zwei identischen RNA-Einzelsträngen, die von einem konischen Kapsid umgeben werden (siehe Abbildung 1). Dieses Kapsid wird aus dem Protein p 24 gebildet. Zudem wird die RNA noch von einem Nukleokapsid umschlossen. Außer der RNA befinden sich noch Enzyme innerhalb des Kapsids, u.a. die reverse Transkriptase, die Integrase und die Protease. HIV gehört zu den behüllten Viren. Die Hülle setzt sich aus einer Reihe von Matrixproteinen zusammen, die außen von einer Doppellipidmembran umfasst werden. In dieser Hülle sitzen Oberflächenproteine wie der Env-Glykoproteinkomplex. Der Komplex verfügt über einen transmembranären (gp 41) und einen externen Anteil (gp 120) (11).

Neben diesen Strukturproteinen und -Enzymen synthetisiert das HI-Virus Regulatorproteine wie das Tat-Protein (11). Tat steht für transactivator of transcription, das Protein stimuliert also die Transkription des Virus (11). In dieser Funktion wirkt es vor allem im Zellkern der infizierten Zelle (11). Zudem soll es bei verschiedenen pathogenetischen Vorgängen während der HIV-Infektion eine Rolle spielen (11). Unter anderem sorgt Tat dafür, dass in den Astrozyten vermehrt GFAP gebildet wird (17).

Einleitung

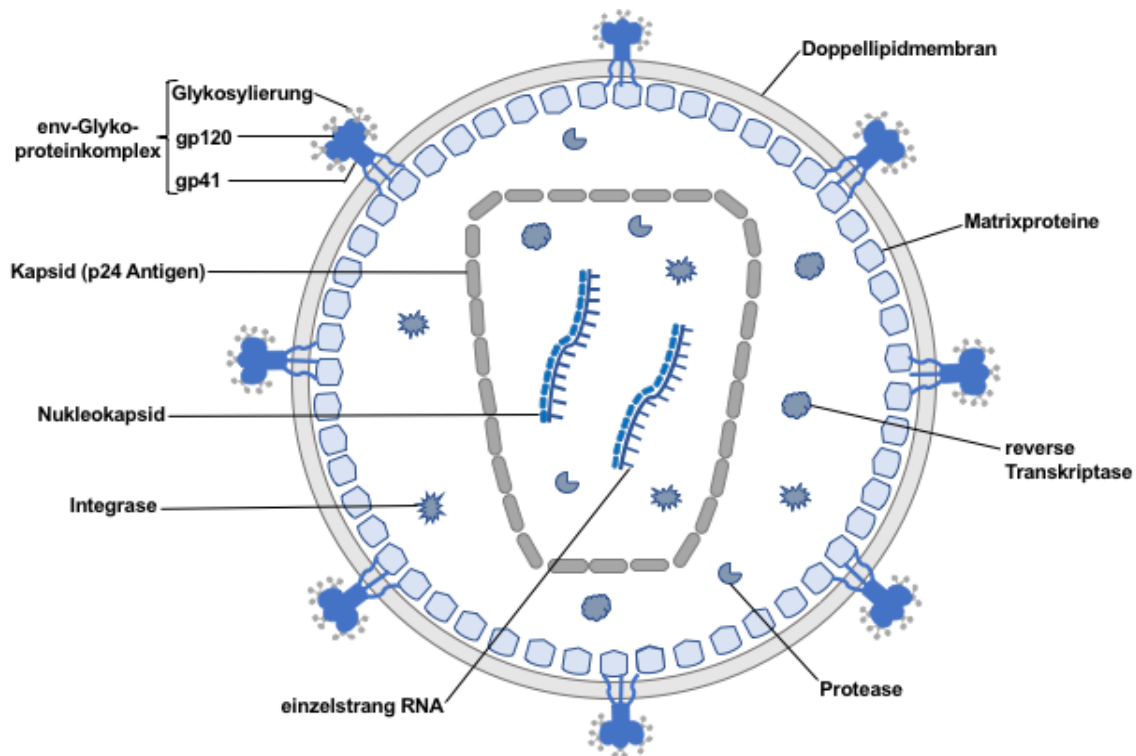


Abbildung 1 Aufbau des HI-Virus

Das Virus besitzt zwei RNA-Einzelstränge, die von einem Nukleokapsid umhüllt werden. Dieses wird wiederum von einem konischen Kapsid aus Protein p24 umschlossen. Innerhalb des konischen Kapsids können sich Enzyme befinden, u.a. die Protease, die Integrase und die reverse Transkriptase. Die Hülle des Virus besteht aus einer Doppellipidmembran und einer darunter liegenden Schicht aus Matrixproteinen. Die Hülle trägt außerdem den env-Glykoproteinkomplex. Dieses Oberflächenprotein wird aus den Glykoproteinen gp 120 (externer Anteil) und gp 41 (transmembranärer Anteil) gebildet.

env = engl.: envelop; gp = Glykoprotein; RNA = engl.: ribonucleic acid

Eigene Abbildung, modifiziert nach: Thomas Spletstoesser, 2014

1.1.4 Replikationszyklus

In der Regel dringen Viruspartikel oder infizierte Zellen über die Schleimhäute oder das Blut in den Körper ein (11). Hier binden sie an Oberflächenrezeptoren der Wirtszellen (11). Als wahrscheinlich gilt, dass die Viren zuerst mit Zellen des monozytären Systems (Makrophagen, Monozyten) und den dendritischen Zellen (u.a. Langerhans-Zellen) in Kontakt treten (11). HIV kann Zellen infizieren, die den CD4-, den CCR5- oder den CXCR4-Rezeptor exprimieren (18).

Das Glykoprotein gp 120 des Virus bindet an ein Oberflächenprotein der Wirtszelle, den CD4-Rezeptor (19). Durch eine Konformationsänderung ist gp 120 nun in der Lage an den Korezeptor (CCR5 oder CXCR4) zu binden (20). HI-Viren, die ausschließlich CCR5 nutzen werden „R5-Viren“ genannt, während Viren, die ausschließlich CXCR4 nutzen, X4-Viren genannt werden. Oft nutzt HIV

Einleitung

jedoch beide Rezeptoren (20). Die Rezeptornutzung hat Einfluss auf den Tropismus der Viren. Es gibt Menschen mit Deletionen im CCR5-Rezeptor-Gen (11), diese Menschen können nicht mit R5-Viren infiziert werden und gelten als „resistent“ (11).

Nach Bindung an den Korezeptor kommt es zu weiteren Wechselwirkungen zwischen dem Glykoprotein gp 120 des Virus und dem Oberflächenrezeptor der Wirtszelle, die letztendlich zur Fusion der Membranen von Virus und Wirt führen (20). Nun können die virale RNA und Proteine wie die reverse Transkriptase, die Integrase und die Protease in die Wirtszelle gelangen (19).

Die reverse Transkriptase produziert eine doppelsträngige DNA aus der Einzelstrang-RNA des Virus (11). Diese DNA wird dann von der Integrase in das Genom der Wirtszelle eingebaut (11). Die Transkription erfolgt durch die zelluläre RNA-Polymerase II (11). Die RNA-Polymerase II und die reverse Transkriptase arbeiten mit einer gewissen Fehlerrate und sind beide nicht in der Lage Korrekturen durchzuführen (11); (21). Während der Transkription entstandene Mutationen tragen somit entscheidend zur genetischen Variabilität des Virus bei und helfen HIV den Abwehrreaktionen des Immunsystems zu entgehen (11).

Nach der Translation lagern sich die Proteine und die RNA an der Zytoplasmamembran der Zelle zu unreifen Viruspartikeln zusammen (11). Das unreife Partikel wird aus der Zelle freigesetzt und von der viralen Protease aktiviert (11). Nun ist das Virus infektiös und kann weitere Zellen befallen (11). Dies gilt vor allem für T-Helferzellen, die Zusammenlagerung zu reifen Viruspartikeln findet bei Makrophagen intrazellulär statt (11). Das infektiöse Virus wird nicht aus der Zelle freigesetzt und entgeht somit der Erkennung durch das Immunsystem (11).

1.1.5 Transmission

HIV kann horizontal und vertikal übertragen werden. Die horizontale Übertragung findet hauptsächlich durch Sexualkontakte statt (11). Dabei spielt die Art des Geschlechtsverkehrs eine Rolle (22). Die Infektionswahrscheinlichkeit pro Kontakt bei ungeschütztem, rezeptiven Analverkehr mit einem HIV-positiven Partner kann bis zu 1,43 % betragen (22). Wohingegen das Übertragungsrisiko bei rezeptivem ungeschütztem Vaginalverkehr mit bis zu 0,15 % angegeben wird

Einleitung

(22). Weiterhin beeinflussen die Viruslast, Beschneidungen und das Vorhandensein von anderen sexuell übertragbaren Infektionen oder Schleimhautverletzungen die Wahrscheinlichkeit einer Übertragung (22).

Das Virus kann auch durch Blut und Blutprodukte oder kontaminierte Nadeln („Needle sharing“ bei Drogenabusus oder Stichverletzungen von Personal im Gesundheitssystem) übertragen werden (11). Übertragungen durch Organtransplantationen sind sehr selten, v.a. nach der Einführung von Screeningtests für Spendende (23). In der Literatur werden sporadisch Fälle beschrieben (23), (24), (25).

Die vertikale Übertragung geschieht entweder während der Schwangerschaft (Übertragungsrisiko ohne antiretrovirale Therapie (ART) 25% - 30% (26)), unter der Geburt (Anteil von ca. 30% aller Mutter-Kind-Übertragungen wenn nicht gestillt wird (27)) oder beim Stillen (Übertragungsrate ohne ART ca. 15%; das Risiko ist in den ersten Wochen am höchsten, persistiert aber über die Länge der Exposition (28)) statt (11). In Europa betrug das Risiko einer Mutter-Kind-Übertragung vor der Einführung einer medikamentösen Prophylaxe laut *Deutsch-Österreichischer Leitlinie zur HIV-Therapie in der Schwangerschaft und bei HIV-exponierten Neugeborenen* zwischen 15 % und 25 % (29). Durch die *hochaktive antiretrovirale Therapie*, HAART, konnte die Infektionsrate auf unter 1 % gesenkt werden und sie bildet heutzutage die Grundlage für die Prävention von Mutter-zu-Kind-Übertragungen (PMTCT, prevention of mother-to-child transmission) (29). Weitere Maßnahmen sind ein Stillverzicht, eine medikamentöse Prophylaxe für das Neugeborene oder in Ausnahmefällen bei fortbestehender hoher Viruslast der Mutter ein Kaiserschnitt (29).

Die WHO definiert sogenannte „key population groups“, also Gruppen, die besonders vulnerabel für eine HIV-Infektion sind (7). Zu diesen Gruppen gehören MSM (men having sex with men), Sexarbeiter und Sexarbeiterinnen, Strafgefangene, Transsexuelle und i.v. Drogenabhängige (7). Im Jahr 2018 betrafen erstmals mehr als die Hälfte aller Neuinfektionen Angehörige dieser Schlüsselgruppen und ihnen nahestehende Personen (7). In Osteuropa, Zentralasien, Nordafrika und im Mittleren Osten gehen sogar 95 % aller Neuinfektionen auf diese Gruppen zurück (7).

Einleitung

1.1.6 Histopathologie

Aus histopathologischer Sicht kann das HI-Virus den Körper auf unterschiedliche Arten schädigen (18). Der Verlust der zellvermittelten Immunität durch den Abfall an funktionsfähigen CD4+ T-Zellen begünstigt nicht nur opportunistischen Infektionen (18), auch onkogene Viren können schlechter bekämpft werden. Das führt zu Tumorleiden wie dem Burkitt-Lymphom oder dem Kaposi-Sarkom (18). Die CD4+ T-Zellen werden durch komplexe Vorgänge zerstört (30). Der Replikationszyklus des Virus wird angehalten und die Zwischenprodukte rufen eine Immunreaktion der Zelle hervor (30). Diese Reaktion wird durch Interferon I und die Enzyme Caspase 1 oder Caspase 3 vermittelt (30). Die Signalkaskade mit Caspase 3 führt zur Apoptose der Zelle, ohne dass eine inflammatorische Reaktion ausgelöst wird (30). Dies geschieht jedoch nur in aktivierten CD4+ T-Zellen (30). Etwa 5 % der CD4+ T-Zellen im lymphatischen Gewebe sind aktiviert (30). Die ruhenden T-Zellen hingegen sterben durch Caspase 1 getriggerte Pyroptose (30). Die Pyroptose ist eine hochinflammatorische Form des programmierten Zellsterbens (30). Der Zellinhalt wird in den extrazellulären Raum entlassen, darunter Zytokine und Entzündungsmediatoren (30). Die Zytokine lotsen andere CD4+ T-Zellen in das infizierte Gewebe, wo diese ebenfalls sterben und die entzündliche Reaktion verstärken (30). Es entsteht ein Teufelskreis (30).

Dieser und andere Vorgänge führen zu einer konstanten Aktivierung des Immunsystems und einer chronischen Entzündungsreaktion (18). Ein dauerhaft aktiviertes Immunsystem führt zur Ausschüttung von Entzündungsmarkern, einem veränderten Stoffwechsel und vermehrten Sauerstoffradikalen (18). Dadurch kann HIV auch indirekt Einschränkungen der Organfunktionen auslösen (18). Ein weiterer indirekter Weg auf dem HIV zu Beeinträchtigungen führen kann ist die Endothelzell-dysfunktion (18). Eine Endothelzell-dysfunktion kann die Verstopfung von kleinen Gefäßen bewirken, das wiederum erleichtert die Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen (18). Es wird vermutet, dass diese beiden Mechanismen chronische Erkrankungen wie Schlaganfall, Leberzirrhose, Myokardinfarkt, venöse Thrombembolien, COPD, Osteopenien und neurokognitive Schädigungen hervorrufen (18). Allerdings ist hohes Alter

Einleitung

ebenfalls ein Risikofaktor für die Entstehung oben genannter Erkrankungen, der Einfluss von HIV auf die Pathogenese ist daher schwierig zu bemessen (18).

1.1.7 Klinik

Die akute HIV-Infektion kann mononukleoseähnlich oder asymptomatisch verlaufen (31). Zu den möglichen Symptomen zählen Fieber, Lymphknotenschwellungen, Kopfschmerzen, Halsschmerzen, Schluckbeschwerden, Durchfall oder ein Hautausschlag (31). Meist klingen diese Symptome nach sieben bis vierzehn Tagen wieder ab (31). Seltener kann es auch zu einer vorübergehenden Meningoenzephalitis kommen (18). Die Infektiosität ist in diesem Stadium besonders hoch (31), da die Viruslast im typischerweise Werte von 10^6 Viren pro ml Blut erreichen kann (18). Der Körper hat noch keine Antikörper gebildet und die Zahl der CD4+ T-Zellen sinkt von ca. 1000 Zellen pro μl (Normalbefund) auf ca. 500 Zellen pro μl Blut (18).

Das darauf folgende Latenzstadium kann Monate bis Jahre dauern (31). Es ist größtenteils durch Symptomfreiheit gekennzeichnet, teilweise kann es zu schmerzlosen Lymphadenopathien kommen (31). Während der gesamten klinischen Latenzzeit findet Virusreplikation statt, mit typischen Werten von 10^3 - 10^4 HIV-Partikeln pro ml Blut (18). Die CD4+ T-Zellen erholen sich zu Beginn dieses Stadiums, auf ca. 700 Zellen/ μl (18). Im Laufe der Zeit kann der Körper den Verlust von T-Zellen allerdings nicht mehr kompensieren und es kommt zu einem stetigen Abfall der CD4+ T-Zellen (18). Während dieser Latenzphase mit leicht eingeschränkter Immundefunktion können Erkrankungen wie z.B. Herpes Zoster oder Mundsoor auftreten. Hinzu kommt eine Fülle an unspezifischen Symptomen, u.a. Hautveränderungen, Müdigkeit und Beschwerden des Magen-Darm-Traktes oder des Nervensystems (31).

Sinkt die Zahl der T-Helferzellen unter 200 Zellen pro μl , wird das AIDS-Stadium erreicht (32). Durch die stark abnehmende Immunität kommt es zu opportunistischen Infektionen (18). Die *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), eine Behörde des amerikanischen Gesundheitsministeriums, hat eine Liste mit AIDS-definierenden Erkrankungen veröffentlicht (32). Auf dieser Liste steht unter anderem die *Pneumocystis-jirovecii*-Pneumonie, die in 45 % der Fälle in Deutschland die primäre AIDS-Manifestation darstellt (33).

Einleitung

Weitere AIDS-definierende Erkrankungen sind u.a. die zerebrale Toxoplasmose, die Tuberkulose, die Candidiasis des Ösophagus, die Salmonellensepsis oder die CMV-Retinitis (32). Ohne Therapie dauert es etwa acht bis zehn Jahre von der Serokonversion bis zum Auftreten erster AIDS-definierender Symptome (34).

Die Pathologien der Organsysteme können auf die Dysregulation des Immunsystems, Komorbiditäten, Koinfektionen, zusätzliche Risikofaktoren oder die Toxizität der antiretroviralen Medikation zurück geführt werden (35). Meist sind Nieren, Leber, Verdauungstrakt, Gehirn oder Herz-Kreislaufsystem betroffen (18).

Chronische Erkrankungen der Nieren sind häufig bei HIV-Infizierten, Studien in Subsahara-Afrika ergaben eine Prävalenz von 6 % - 48 % (36). Typische Affektion der Nieren sind die HIV-assoziierte Nephropathie (HIVAN) und die HIV-assoziierte Immunkomplex-Nephritis (37). HIVAN wird besonders häufig bei Menschen aus Subsahara Afrika oder Afroamerikanern und Afroamerikanerinnen beschrieben (37), (18).

Bei der sogenannten HIV-Enteropathie kommt es zu Veränderungen in der histologischen Architektur des Magendarmtraktes (18). Die Enterozyten gehen zu Grunde und die Lymphfollikel hyperplasieren (18). Es kommt zu einer Kryptitis und in der Folge zum gänzlichen Verschwinden der Krypten (18). Zu den Symptomen gehören Diarrhoe und Gewichtsverlust (18). Beträgt der ungewollte Gewichtsverlust mehr als 10 % des Körpergewichts und dauert die Diarrhoe länger als 30 Tage spricht man vom „wasting“ Syndrom (38). Wenn opportunistische Erreger als Ursache ausgeschlossen werden können und die Symptome sich durch eine ART verbessern, kann von einer HIV-Enteropathie ausgegangen werden (18).

Zu den bekannten Risikofaktoren für koronare Herzerkrankungen kommen bei Menschen, die mit HIV leben (people living with HIV, PLWH) noch eine Endothelzellaktivierung und häufig eine Dyslipidämie als Nebenwirkung der ART hinzu (18). Auch kardiotope Viren, Myokarditis und Herzinsuffizienz erhöhen die kardiovaskuläre Risikosituation (18). Das Risiko an einer Herzkreislauferkrankung zu versterben scheint jedoch zu sinken, laut einer

Einleitung

Multikohortenstudie mit knapp 50 000 Patienten und Patientinnen sank die Zahl der Toten um 65 % (35).

Die Leber kann auf vielfältige Weise durch HIV und die Folge der Infektion geschädigt werden (39). Es ist noch nicht abschließend geklärt ob die Auswirkungen auf die Leber auf die HIV-Infektion selbst, die Immunsuppression, die Therapie oder andere Faktoren zurückzuführen sind (39). Bei HIV-monoinfizierten Patienten und Patientinnen ist eine hohe Viruslast ein unabhängiger Risikofaktor für erhöhte Leberenzyme und eine Steatose (39). Bei zusätzlichem Alkoholkonsum oder Koinfektion mit Hepatitis B oder C verstärken sich die negativen Effekte auf die Leber (39).

1.1.1 Therapie und Prävention

Die Einführung von HAART (highly active antiretroviral therapy), einer Kombination von mindestens drei antiretroviral wirksamen Medikamenten als HIV-Therapie, hat zu einer massiven Abnahme der AIDS-Todesfälle geführt (40). Berechnungen gehen davon aus, dass weltweit durch HAART zwischen 1995 und 2009 etwa 14,4 Millionen Lebensjahre bei Erwachsene hinzugewonnen werden konnten (41). Die Lebenserwartung von PLWH hat sich sowohl in einkommensschwachen als auch in einkommensstarken Ländern deutlich verbessert. In Ruanda beträgt sie 60 % der Lebenserwartung der HIV-negativen Bevölkerung, in Kanada 90 % (42). Die antiretroviralen Medikamente bewirken außerdem eine signifikante Reduktion des Infektionsrisikos durch Geschlechtsverkehr bei serodiskordanten Paaren (43). „Therapie als Prävention“ wurde somit Teil der WHO-Strategie zur Eindämmung der globalen HIV-Epidemie (44).

Die antiretroviralen Medikamente sind sehr effektiv, sie können die Viruslast im Plasma innerhalb weniger Monate unter die Nachweisgrenze senken (40). Zur Initialtherapie stehen laut deutsch-österreichischer Leitlinie vier verschiedene Wirkstoffgruppen zur Verfügung: Nukleotid-/ Nukleosidanaloga (NtRTI / NRTI), nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTI), geboosterte Proteaseinhibitoren (PI) und Integraseinhibitoren (INI) (45). Eine effektive Therapie besteht typischerweise aus drei Wirkstoffen aus mindestens zwei unterschiedlichen Gruppen, auf diese Art sollen rasche Resistenzentwicklungen

Einleitung

verhindert werden (45). In Deutschland bestehen bei ca. 11 % der PLWH Resistenzen, daher sollte vor Therapiebeginn immer ein genetischer Test auf resistente HIV-Stränge erfolgen. Um die Therapieregime weiter zu vereinfachen wurden *single tablet regimens* (STR) eingeführt, eine fixe Kombination von mehreren Wirkstoffen in einer Tablette (40). Heutzutage verwendet man statt HAART häufiger die Begriffe ART (antiretroviral therapy) oder cART (combined antiretroviral therapy). Ein sofortiger Therapiebeginn unabhängig von der CD4+ Zellzahl hat signifikante Vorteile (46) und wird auch in den deutschen Leitlinien empfohlen (45).

Geheilt werden können die Patienten und Patientinnen durch eine ART nicht (47). Wenn die Medikamente abgesetzt werden, kommt es bei einem Großteil nach einem bis drei Monaten zu einem erneuten Anstieg der Plasmavirämie auf die gleichen Level wie vor Therapiebeginn (48). Grund dafür sind wahrscheinlich sogenannte „Reservoirs“, in denen das Virus den Effekten der antiretroviralen Medikamente entgehen kann (49), (50). Zu diesen Reservoirs gehören CD4+ T-Zellen (51) und möglicherweise auch Makrophagen, insbesondere die Mikrogliazellen (47, 52) und hämatopoetische Stammzellen (53). Weiterhin werden Astrozyten, Epithelzellen, dendritische Zellen und folliculäre dendritische Zellen als mögliche Reservoirs genannt (54). Die Rolle dieser Zellen ist Gegenstand der aktuellen Forschung und zum Teil noch unverstanden (54). Die Hoffnung ist, dass HIV mit der Elimination der Reservoirs zu einer heilbaren Erkrankung wird (54).

Ein weiteres Konzept zur Eindämmung der HIV-Epidemie ist die Prophylaxe. Es gibt die Präexpositionsprophylaxe (PrEP) für HIV-negative Menschen, die ein erhöhtes Ansteckungsrisiko haben, z.B: Mitglieder der oben beschriebenen *key population groups* (55). In Deutschland ist für diese Indikation die Wirkstoffkombination Emtricitabin/Tenofovir-Disoproxil zugelassen und empfohlen (55). In Studien zeigte sich bei hoher Compliance (tägliche Einnahme) eine Risikoreduktion von 99 % (56).

Für Personen, die ungeschützten Geschlechtsverkehr mit einer HIV-positiven Person hatten, kontaminierte Instrumente oder Injektionsbestecke genutzt haben, deren Schleimhäute oder offene Wunden mit kontaminierter Flüssigkeit Kontakt hatten oder die eine Transfusion mit kontaminiertem Blut erhalten haben

Einleitung

besteht die Möglichkeit einer Postexpositionsprophylaxe (PEP) (57). Die PEP sollte möglichst rasch, idealerweise innerhalb von zwei Stunden, nach Exposition eingenommen werden, um die bestmögliche Wirksamkeit zu erzielen (57). Zur Zeit wird in der deutschen Leitlinie als Standardprophylaxe die Kombination von Emtricitabin/Tenofovir-Disoproxil mit einem Integrase-Inhibitor empfohlen (57).

1.2 HIV und das zentrale Nervensystem

1.2.1 Infektion des ZNS

HIV gelangt bereits kurz nach der Ansteckung in das zentrale Nervensystem (47), (58), (59). Man vermutet, dass infizierte CD4+ Zellen und Monozyten die Blut-Hirn-Schranke überwinden können (60), (47), (61). Es ist zudem wahrscheinlich, dass die Blut-Hirn-Schranke während der akuten HIV-Infektion durchlässiger wird (60) und dass das Virus und seine Proteine sie auch außerhalb von Zellen überwinden können (62). Eine Hypothese besagt, dass die erhöhte Permeabilität durch das virale Protein Tat verursacht wird (61). Es verändert die Proteinexpression der Zellen, die die Blut-Hirn-Schranke bilden (61). Im ZNS angelangt setzen die infizierten Zellen Viruspartikel frei, die dann andere Zellen im Gehirn infizieren (60). Die freigesetzten Viruspartikel und -proteine führen außerdem zu einer Aktivierung der umgebenden Zellen (60). Die aktivierten Zellen sekretieren Entzündungsmarker und andere Chemokine, zudem ändert sich ihr Stoffwechsel (60). All diese Vorgänge führen zu einer Schädigung von neuronalen Strukturen, einer erhöhten Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke und einer chronischen Entzündungsreaktion im Gehirn (60).

1.2.2 Histopathologie

Autopsiestudien aus der Anfangszeit der HIV-Epidemie zeigen, dass 75 % - 90 % der Gehirne histopathologische Auffälligkeiten aufwiesen (63), (64). Die neuropathologischen Veränderungen korrelierten nicht immer mit der Klinik (64), (63). Zu diesen Auffälligkeiten gehören Veränderungen durch opportunistische Infektionen, Inflammation, Veränderungen der weißen Substanz, Enzephalitis, Nekrosen, Demyelinisierung, Astrozytose und Gefäßkomplikationen (63), (64).

Einleitung

1.2.3 Opportunistische Infektionen des ZNS

Opportunistische Infektionen waren vor der Einführung von ART ebenfalls ein häufiges Problem (64). Die häufigsten opportunistischen ZNS-Infektionen und ihre Erreger sind auch AIDS-definierende Infektionen, hierzu gehören das Zytomegalievirus, die Kryptokokken-Meningitis, die Toxoplasmose, die progressive multifokale Leukenzephalopathie und die Tuberkulose (65). In Europa und Nordamerika sank die Inzidenz von neurologischen opportunistischen Infektionen nach Einführung der antiretroviralen Therapie bis zum Jahr 2006 auf 1 pro 1000 Patientenjahre (65).

1.2.4 Klassifikation von HAND

Alle Formen der neurokognitiven Beeinträchtigung werden unter dem Begriff *HIV-associated neurocognitive disorders* (HAND) zusammen gefasst (66). Es gibt drei Formen von HAND: *asymptomatic neurocognitive impairment* (ANI), *mild neurocognitive disorder* (MND) und *HIV-associated dementia* (HAD) (66). Kennzeichnend für ANI ist, dass die Abnahme der neurokognitiven Fähigkeiten keine Einschränkungen für die Alltagsaktivitäten der entsprechenden Person herbeiführt. Bei der MND führen die verminderten Fähigkeiten zu leichten Beeinträchtigungen der Alltagsaktivitäten, während die HAD durch starke Behinderungen beim Lernen von neuen Informationen, der Aufmerksamkeit und der Aktivitäten des alltäglichen Lebens bestimmt wird (66). Vor Diagnosestellung sollten eine schwere Depression, ein Delir oder andere vorbestehende Erkrankungen als Ursache für die Beeinträchtigungen ausgeschlossen werden (66). Vorzugsweise sollte die Quantifizierung der neurokognitiven Einschränkungen folgende Bereiche abdecken: Sprache, Aufmerksamkeit, Abstraktionsvermögen, Gedächtnis, Auffassungsgabe, motorische Fähigkeiten und sensorische Wahrnehmung (66).

HAND ist auch in der ART-Ära ein ernstzunehmendes gesundheitliches Problem für PLWH. In einer Querschnittsstudie aus dem Jahr 2010 wurden 1555 HIV-positive Erwachsene auf neuropsychologische Beeinträchtigungen untersucht, bei 52 % konnten solche Defizite festgestellt werden (67). Die Prävalenz von ANI wurde auf 33 %, die von MND auf 12 % und von HAD auf 2 % geschätzt (67).

Einleitung

HAND beginnt oft schleichend und nimmt einen protrahierten Verlauf, dies erschwert die Erkennung von neuen Symptomen (68). Am Anfang beklagen sich HAND-Patienten über leichte Gedächtnis- und Konzentrationsprobleme (69). Im weiteren Verlauf können psychomotorische Verlangsamung, depressive Verstimmung und Gereiztheit hinzu kommen (69). Leichte motorische Symptome können ebenfalls auftreten, schwere motorische Einschränkungen und Veränderungen des Gangbildes sind jedoch inzwischen selten geworden (69). Im Gegensatz zur Alzheimer Demenz haben HAND-Patientinnen und Patienten typischerweise keine fokal-neurologischen Defizite (70). Sie lernen neue Informationen zwar nur unter Schwierigkeiten, zeigen aber nicht das Alzheimer-typische Vergessen von gelernten Informationen (70).

1.2.5 Therapie

Neurologische Symptome waren vor der Einführung von ART und cART sehr häufig, 50 % der HIV Infizierten entwickelten eine Demenz (70). Nach Einführung der Therapie sank die Zahl schwerer Demenzen, dafür traten milderen Formen der neurokognitiven Beeinträchtigung in den Vordergrund (70). Es gibt keine spezifische Therapie für HIV-assoziierte neurologische Erkrankungen. Bei allen Patienten mit HAND soll eine cART unabhängig von der CD4+ Zellzahl erfolgen (45).

1.3 Das saure Gliafaserprotein (GFAP)

1.3.1 Vorkommen

Das glial fibrillary acidic protein (GFAP), zu deutsch saures Gliafaserprotein, ist ein Hauptbestandteil der Intermediärfilamente von Astrozyten (71). Intermediärfilamente sind eine Komponente des Zytoskeletts und sorgen für die mechanische Stabilität einer Zelle (71). Astrozyten zählen zu den Gliazellen des Gehirns (72). Sie erbringen nicht nur metabolische und strukturelle Unterstützung für die Neurone (73), sie sind auch wichtig für die Schlafregulation (74), die Synapsenfunktion (75), die Eigenschaften der Blut-Hirn-Schranke (76) und höhere kognitive Funktionen wie das Gedächtnis (77). GFAP kommt fast ausschließlich in Astrozyten (71) vor. Außerhalb des ZNS kann

Einleitung

GFAP in den Schwann-Zellen der peripheren Nervenscheiden und den Gliazellen des enterischen Nervensystems gefunden werden (78).

Außerdem kann GFAP nach Schädel-Hirn-Traumata (79) oder bei chronischen Erkrankungen wie Alzheimer (80) und Multipler Sklerose (81) vermehrt in Liquor und Serum nachgewiesen werden.

1.3.2 Pathogenese

GFAP spielt eine Rolle bei den Prozessen der Astrozytose, worunter man eine Reihe von Reaktionen der Astrozyten auf Verletzungen oder Erkrankungen des ZNS versteht (78). Neben dem Begriff der Astrozytose wird in der Literatur auch häufig der Begriff ‚Astrogliose‘ verwendet (82). Zur Vereinheitlichung wird in dieser Promotion lediglich die Bezeichnung ‚Astrozytose‘ genutzt. Die Astrozytose ist gekennzeichnet durch ein vermehrtes Vorkommen und einen Größenzuwachs von GFAP exprimierenden Zellen (17). GFAP sorgt während der Astrozytose für die Verlängerung, Schwellung und Verdichtung der Fortsätze der Astrozyten (78). GFAP könnte durch seine elementaren Funktionen für das Zytoskelett der Astrozyten ebenfalls Einfluss auf die Neurophysiologie, wie z.B. die Erregungsübertragung am synaptischen Spalt, nehmen (83).

Ein gutes Modell um die Auswirkungen von Störungen in der GFAP-Synthese für das Gehirn zu verdeutlichen ist die Alexander Krankheit (84). Sie beruht auf genetischen Mutationen in der Region von Genen, die für GFAP kodieren (85, 86). Betroffene leiden unter anderem an Krampfanfällen, psychomotorischer Retardierung, Makrozephalie, Ataxie und spastischen Paresen (87). Die neonatale Variante verläuft besonders schwer, innerhalb der ersten zwei Lebensjahre kommt es zu schweren Behinderungen und zum Tod (88).

Im Hinblick auf HIV existieren deutliche Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen GFAP, dem viralen Protein Tat und der Pathogenese von HAND (17, 89, 90). Tat induziert eine verstärkte GFAP-Expression (17). Die hochregulierte GFAP-Expression begünstigt die Entstehung einer Astrozytose und hat neurotoxische Effekte (17). Wie bereits in Kapitel 1.2.2 erwähnt, ist die Astrozytose ein signifikantes Merkmal HIV-assoziiertes neurologischer Erkrankungen (63, 90).

Einleitung

1.3.3 Autoimmunität

Es wird vermutet, dass die GFAP-Autoantikörper nicht die Ursache von neurologischen oder pathologischen Veränderungen sind, da GFAP sich intrazellulär befindet und somit außerhalb der Kontrolle von zirkulierenden Antikörpern liegt (91). GFAP-Autoantikörper könnten jedoch Ausdruck einer T-Zell vermittelten Immunreaktion sein (91). Autoreaktive GFAP-spezifische CD8+ T-Zellen könnten den Toleranzmechanismen des Körpers entgehen und nach ihrer Aktivierung Schäden der weißen und grauen Substanz des Gehirns induzieren (92).

Autoantikörper gegen GFAP wie sie in dieser Doktorarbeit gemessen wurden, werden außerdem oft im Zusammenhang mit der autoimmunen GFAP-Astrozytopathie genannt (91, 93, 94). Die GFAP-Astrozytopathie ist durch eine Meningoenzephalomyelitis mit spezifischen MRT-Veränderungen und einer Besserung durch Immuntherapie gekennzeichnet (95). Auch hier sind die GFAP-IgG höchstwahrscheinlich nicht pathogenetisch, sie dienen lediglich als Biomarker für die Entzündungsreaktion des Immunsystems (91).

1.4 Zielsetzung

Das Ziel der Arbeit ist es, das Vorkommen von GFAP-Autoantikörper bei Menschen mit HIV zu untersuchen. Es soll erkundet werden, ob es Unterschiede im Antikörpervorkommen zwischen verschiedenen Gehirnarealen und zwischen HIV-Patienten /-Patientinnen und Kontrollen gibt. Weiterhin soll die Rolle dieser Autoantikörper und damit die Rolle von GFAP bei der Pathogenese von HAND beleuchtet werden. Ein weiterer Fokus liegt auf möglichen Korrelationen zwischen der Menge an Autoantikörpern bei PLWH und ihrem Abschneiden bei neurokognitiven Tests. So soll eruiert werden, ob Anti-GFAP-Autoantikörper als Marker für die Schwere von HIV-assoziierten neurokognitiven Erkrankungen genutzt werden könnten.

Material

2. Material

2.1 Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Arbeitswerkbank	BSB 4A	Gelaire
Eismaschine	AF-10	Scotsman
Feinwaage	HL52	Mettler & Geissen
Erfassung der Western Blot Membranen	Odyssey Fc Dual-Mode Imaging System	Li-Cor Biosciences
Gefrier- und Kühlschrank		Bosch / Liebherr
Heizblock	TDB 120	Biosan
Magnetrührer		Janke und Kunkel
Mikroliterpipetten	2, 200, 1000 µl	Gilson
	10 – 100 µl	Eppendorf
Plattformschwenker	PR50	Instruments
SDS-PAGE Laufkammer	XCell Surelock® mini	Invitrogen
Tischzentrifuge		Heraeus
Vortexer	L46	GLW

Material

2.2 Glas

Material	Typ	Hersteller
Erlenmeyerkolben	250 ml	Schott
Messzylinder	50 ml, 100 ml	Schott
Pipetten	5 ml, 10 ml, 25 ml	Brand

2.3 Kunststoff

Material	Typ	Hersteller
Membranfilter	Nitrocellulose (0,45 µm)	Whatman
Gradientengel	Bolt™ 4-12% Bis-Tris Plus, 15 Wells, 1 mm	Thermo Fisher Scientific
Handschuhe	Powder free nitrile	SensiCare Ice
Nitrocellulose Blotting Membran	Amersham™ Protran™ 0,45 µm NC	GE Healthcare Life science
Pipettierbälle		Hartenstein
Pipettenspitzen	1 – 1000 µl	Hartenstein
Pipettenspitzen mit Filter	0,5 – 10 µl	Nerbe plus
	0 – 20 µl	Nerbe plus
	0 – 200 µl	Nerbe plus, Biozym
	1000 µl	Biozym, Hartenstein
Plastikschale		Hartenstein
Reaktionsgefäß	1,5 ml	Eppendorf
Wägeschalen		Hartenstein

Material

Schwamm-Pad	Invitrogen Sponge Pad for Blotting	Thermo Fisher Scientific
Zentrifugenröhrchen	50 ml	Greiner GBO

2.4 Chemikalien

Substanz	Firma / Zusammensetzung
Formaldehyd 37%	Roth
Magermilchpulver	AppliChem
PBS	137 mM Natriumchlorid 2,7 mM Kaliumchlorid 12 mM Phosphat Wasser, pH 7,4
Tween-20	AppliChem
WesternSure® ECL Substrat (Luminol Enhancer Lösung und Peroxidase Lösung)	Li-Cor Biosciences

2.5 Puffer

Puffer	Name	Firma
Ladepuffer	NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4X)	Thermo Fisher Scientific
SDS-Puffer	Bolt™ MOPS SDS-Running Buffer (20X)	Thermo Fisher Scientific
TE-Puffer		Sigma Aldrich
Transferpuffer	Bolt™ Transfer Buffer (20X)	Thermo Fisher Scientific

Material

2.6 Antikörper und Enzyme

Antikörper und Enzyme	Firma
F(ab') ₂ -Goat anti-Human Kappa Light Chain Secondary Antibody, - HRP, Katalognr.: PA1-74407	Thermo Fisher Scientific
Proteinase-Inhibitor	Sigma Aldrich

2.7 Größenstandards

Größenstandards	Firma
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific

2.8 Programme

Programm	Hersteller
EndNote (Version X9.3.2 für Macintosh)	Clarivate Analytics
GraphPad Prism (Version 7 für Macintosh)	GraphPad Software Inc.
SPSS Statistics (Version 25.0.0.1 für Windows)	IBM
Image Studio™ Lite (Version 5.2.5 für Macintosh)	Li-Cor Biosciences
Excel (Version 16.33 für Macintosh)	Microsoft
Power Point (Version 16.33 für Macintosh)	Microsoft
Word (Version 16.33 für Macintosh)	Microsoft

Material

2.9 Sonstiges

Material	Hersteller
Händedesinfektionsmittel	Sterilium Virugard von Paul Hartmann AG
Flächendesinfektionsmittel	Terralin Protect von Schülke & Mayr
Schutzbrille	Roth
Überziehschuhe	CPE efficient
Handschuhe	Medline

3. Methoden

Ziel der Arbeit war es herauszufinden ob GFAP-Autoantikörper im Serum von HIV-Patienten und -Patientinnen vorhanden sind. Zu diesem Zwecke mussten zuerst Membranen hergestellt werden, auf denen sich GFAP befand. Es wurden Gewebeschnitte von verschiedenen Gehirnarealen homogenisiert und mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot auf eine Membran übertragen. Das Serum der Versuchspersonen wurde dann mit diesen Membranen inkubiert. Die Antikörper im Serum sollten so an das GFAP auf der Membran binden. Diese Bindung sollte mit Hilfe eines zweiten Antikörpers sichtbar gemacht. Im nächsten Schritt wurden die Membranen digitalisiert und es fand eine semiquantitative Auswertung der Signalintensität der verschiedenen Areale statt. Auf diese Art gelang ein indirekter Nachweis der Bindung von Autoantikörpern im Blut der Patienten an das saure Gliafaserprotein aus den Gehirnhomogenaten.

3.1 Gehirnhomogenate

3.1.1 Gewebe

Die Gewebeschnitte stammen aus der Neuro-Biobank des Hertie-instituts für klinische Hirnforschung in Tübingen. In dieser Arbeit wurde die Gewebeschnitte von zwei neurologisch gesund verstorbenen Spendern (Nr. 41 und Nr. 51) verwendet. Es standen Gewebeproben aus sieben unterschiedlichen Gehirnarealen dieser Spender zur Verfügung: DM (dorsaler Motornucleus des Nervus Vagus), LC (Locus Coeruleus / Subcoeruleus), SN (Substantia Nigra), ST (Striatum), MC (temporaler Mesocortex), FC (first order sensory association areas; prä- /motorischer Cortex) und HC (higher order sensory association areas; präfrontaler Cortex). Die sieben Gehirnareale orientieren sich an den Braak-Stadien der Parkinsonpathogenese (96). Braaks Theorie hat für diese Arbeit keine zentrale Bedeutung, jedoch liegen die von ihm definierten Areale in topografisch stark unterschiedlichen Regionen des Gehirns. Diese Tatsache erlaubt eine differenziertere Analyse des GFAP-Antikörper Vorkommens. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der Gehirnhomogenate, ihrer anatomischen Position und Funktion.

Methoden

Tabelle 1 Gehirnhomogenate, ihre Funktionen und ihre anatomische Lokalisation

Abkürzung	Gehirnareal	Anatomie und Funktion des Areals
DM	dorsaler Motornukleus des N. Vagus	<ul style="list-style-type: none"> • auch „Ncl. dorsalis n. vagi“ genannt • liegt in der Medulla oblongata • Ursprung der allgemein-viszeromotorischen Fasern
LC	Locus Coeruleus und Locus Subcoeruleus	<ul style="list-style-type: none"> • Teil von Pons & Medulla oblongata • größte noradrenerge Zellgruppe • am Schlaf-Wachrhythmus beteiligt • in Stresssituationen aktiv, an Entstehung von Stresssymptomen beteiligt
SN	Substantia Nigra	<ul style="list-style-type: none"> • liegt im Mittelhirn • moduliert die Motorik • Teil der Basalganglienschleife
ST	Striatum	<ul style="list-style-type: none"> • liegt im Großhirn • Teil der Basalganglienschleife • moduliert die Motorik
MC	temporaler Mesocortex	<ul style="list-style-type: none"> • Teil der Großhirnrinde • entwicklungsgeschichtlicher Übergang von Allo- zu Isocortex • Verbindungen zum limbischen System (emotionale, triebhafte und intellektuelle Leistungen)
FC	first order sensory association areas	<ul style="list-style-type: none"> • auch „Sekundärfelder“ genannt • für diese Arbeit wurde Gewebe aus dem (prä)motorischen Cortex genutzt • Verarbeitung und Interpretation der Informationen aus den Primärfeldern
HC	higher order sensory association areas	<ul style="list-style-type: none"> • auch „Assoziationsfelder“ genannt • für diese Arbeit wurde Gewebe aus dem präfrontalen Cortex genutzt • komplexe intellektuelle Leistungen

Informationen über Anatomie und Funktion der Gehirnareale aus „Neuroanatomie: Struktur und Funktion“ (97). Informationen zum Mesocortex aus „Psychembel online“ (98).

Methoden

3.1.2 Homogenisierung

Die Homogenisierung der Gewebeschnitte erfolgte durch ein anderes Mitglied der Arbeitsgruppe, Dr. rer. nat. Eva Gschmack. Zu diesem Zwecke wurden die Gewebe mit wenig TE-Puffer versetzt. Dem Puffer wurden Proteinase-Inhibitoren zugegeben um den Abbau von Proteinen entgegenzuwirken. Dann wurden die Proben unter Kühlung mechanisch homogenisiert und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß abgefüllt und die Proteinkonzentration mittels Bradford evaluiert. Die Homogenate wurden bei -20° Celsius eingefroren. Für eine ausführlichere Versuchsbeschreibung wird auf die Promotionsschrift von Frau Dr. rer. nat. Gschmack verwiesen (99).

3.2 SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese dient dazu die in den Gehirnhomogenaten enthaltenen Proteine nach ihrer Molekülmasse aufzutrennen. Die Proteine werden mittels Puffer negativ geladen und auf ein Gel aufgetragen. Das Gel wird in eine Kammer eingespannt und eine elektrische Spannung wird angelegt. Die Proteine laufen nun je nach Molekülmasse durch das Gel. Das Gel wirkt wie ein Sieb, kleine Proteine laufen schneller durch als große. Außerdem läuft ein Proteinmarker mit, anhand dessen sich die Masse der Moleküle abschätzen lässt.

Für diese Versuchsreihe wurde die ‚XCell Surelock mini‘ Laufkammer des Herstellers invitrogen verwendet. Die Homogenate wurden aufgetaut und je 15 µl unter Resuspendierung in ein Eppendorfggefäß überführt. Die Proben wurden mit 5 µl Ladepuffer (NuPAGE LDS Sample Buffer (4X) von Thermo Fisher) versetzt und für fünf Minuten auf 95° Celsius erhitzt. So sollte sichergestellt werden, dass die Proteine denaturiert und negativ geladen sind. Anschließend wurden die Proben für zwei Minuten bei 1400 rpm zentrifugiert. Der SDS-Puffer (Bolt MOPS SDS-Running Buffer (20X) von Thermo Fisher) wurde 1:20 mit destilliertem Wasser verdünnt und in die Laufkammer gegeben. Zur Vorbereitung der Gradientengele (Bolt™ 4-12% Bis-Tris Plus Gele von Thermo Fisher) wurden die Taschen drei Mal mit SDS-Puffer gespült. Daraufhin wurden die Gele in die Laufkammer eingespannt und mit 20 µl des Proben-Puffer-Gemischs beladen. Auf jedes Gel wurde außerdem 1 µl eines Markers (PageRuler Prestained

Methoden

Protein Ladder von Thermo Fisher) als Größenstandard aufgetragen. Zum Schluss wurde die Laufkammer verschlossen und die Gele liefen für 30 Minuten bei 200 Volt.

Tabelle 2 Beladung der Gele

Well	Spender	Areal	Homogenatmenge
1	41	DM	15 µl + 5 µl Puffer
2	41	LC	15 µl + 5 µl Puffer
3	41	SN	15 µl + 5 µl Puffer
4	41	ST	15 µl + 5 µl Puffer
5	41	MC	15 µl + 5 µl Puffer
6	41	FC	15 µl + 5 µl Puffer
7	41	HC	15 µl + 5 µl Puffer
8	Marker		1 µl
9	51	DM	15 µl + 5 µl Puffer
10	51	LC	15 µl + 5 µl Puffer
11	51	SN	15 µl + 5 µl Puffer
12	51	ST	15 µl + 5 µl Puffer
13	51	MC	15 µl + 5 µl Puffer
14	51	FC	15 µl + 5 µl Puffer
15	51	HC	15 µl + 5 µl Puffer

Tabelle 3 Aufbau Blotsandwich

Ein Gel	Zwei Gele
2 Schwämme	2 Schwämme
2 Filter	Filter
Membran	Membran
Gel	Gel
Membran	Membran
2 Filter	Filter
2 Schwämme	Schwamm
	Filter
	Membran
	Gel
	Membran
	Filter
	1 Schwamm

DM = dorsaler Motornucleus des N. Vagus, LC = Locus Coeruleus / Subcoeruleus, SN = Substantia Nigra, ST = Striatum, MC = temporaler Mesocortex, FC = first order sensory association areas, HC = higher order sensory association areas; µl = Mikroliter

Methoden

3.3 Western-Blot mittels tankblot-Verfahren

Um die aufgetrennten Proteine analysieren und quantifizieren zu können, müssen sie mittels Western Blot auf eine Membran übertragen werden. Im nächsten Schritt kann die Membran mit einem Primärantikörper, der im Patientenserum enthalten ist, inkubiert werden. Um die Bindung durch den primären Antikörper nachzuweisen wird ein zweiter Antikörper hinzugegeben, der an den ersten bindet. Dieser Zweitantikörper ist an die Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt, ein Enzym, dass mit dem in der Farbkubationslösung enthaltenem Luminol reagiert. Das so entstandene Licht kann mit einer speziellen Kamera erfasst und quantifiziert werden.

3.3.1 Proteintransfer

Für den Western Blot im ‚tankblot-Verfahren‘ wurde ebenfalls die ‚XCell Surelock mini‘ Laufkammer des Herstellers invitrogen verwendet. Die Gele wurden aus der Laufkammer und ihrem Plastikgehäuse entfernt. Die Taschen und Lippen wurden mit einem Skalpell abgetrennt und die Gele in eine Schale mit Transferpuffer (Bolt Transfer Buffer (20X) von Thermo Fisher) gegeben. Der Transferpuffer wurde zuvor im Verhältnis 1:20 mit destilliertem Wasser verdünnt. Bei der Zusammenstellung des Blotsandwiches muss unbedingt darauf geachtet werden alle Bestandteile konstant feucht zu halten und nach jedem Schritt die Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten auszustreichen. Für die Beladung mit einem Gel werden zwei Schwämme in die Blotkammer gelegt, darauf kommen zwei Filter, eine Membran und das Gel. Hierauf werden wieder eine Membran, zwei Filter und zwei Schwämme gelegt. Wenn zwei Gele gleichzeitig geblottet wurden, wurde das Blotsandwich wie folgt erstellt: zwei Schwämme, dann einen Filter, eine Membran, ein Gel, eine Membran, einen Filter, einen Schwamm, einen Filter, eine Membran, ein Gel, eine Membran, einen Filter und einen Schwamm. Sobald sich alles in der Transferkammer befindet, kann diese fest verschlossen und in das Gehäuse eingesetzt werden. In die Transferkammer wird der Transferpuffer gefüllt, in die äußeren Kammern wird destilliertes Wasser gegeben. Schließlich wird eine Spannung von 30 Volt für 1,5 h angelegt.

Methoden

3.3.2 Blocken und Fixieren

Nach Ablauf der Zeit konnten die Membranen aus dem Blotpaket entfernt und mit TPBS (0,05 % Vol. Tween-20 in PBS) gewaschen werden. Anschließend wurden sie für 20 Minuten bei Raumtemperatur in 2 % Formalinlösung (2 % Vol. Formalin in PBS) geschwenkt um unspezifische Bindungsstellen zu blocken. Dann wurden die Membranen dreimal unter Schwenken mit TPBS gewaschen.

3.3.3 Immunfärbung

Die Immunfärbung mit dem primären Antikörper fand im BSL 3-Labor statt. Die Seren der HIV-positiven Patientinnen und Patienten und die der Kontrollen werden dort bei -80° Celsius gelagert. Nach dem Auftauen wurden je 150 μ l des Serums in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Proben wurden dann für 30 Minuten auf 56° Celsius erwärmt. Die Hitze sollte möglicherweise im Serum enthaltene Pathogene inaktivieren. Nach der Hitzeinaktivierung wurde das Serum im Verhältnis 1:5000 mit Milchlösung (5 % Vol. Magermilchpulver, 0,05 % Vol. Tween in PBS) vermischt und auf die Membranen gegeben. Die Membranen wurden für zwei Stunden bei Raumtemperatur in der Serum-Milchlösung geschwenkt. Als nächstes wurden die Membranen drei Mal für je zwei Minuten mit TPBS gewaschen und danach mit 4 % Formalinlösung (4 % Vol. Formalin in PBS) geblockt.

3.3.4 Farbinkubation und Quantifizierung

Die Farbinkubation fand entweder direkt im Anschluss statt oder nachdem die Membranen über Nacht bei 4° Celsius in TPBS gelagert wurden. Der zweite Antikörper (Goat Anti-Human IgG kappa light chain, HRP, 1:50000) wurde mit einer Milchlösung vermengt und auf die Membranen gegeben. Die Membranen befanden sich für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einer Wippe, bevor sie drei Mal mit TPBS gewaschen wurden. Die ECL-Substanz bestand aus einer Luminol- und Peroxidaselösung (WesternSure ECL Substrat von Li-Cor) und wurde in einem separaten Gefäß vorgemischt. Die Membranen wurden gleichmäßig mit der Lösung benetzt und für fünf Minuten inkubiert. Schließlich konnte die Chemolumineszenzreaktion mit der Kamera des Odyssey Fc Dual-Mode Imaging Systems (Li-Cor) erfasst werden.

Methoden

3.3.5 Auswertung der Signalintensität

Die semiquantitative Messung der Signalintensität fand mit Hilfe der Software Image Studio von Li-Cor statt. Es wurden lediglich die Signalintensitäten von Spender Nr. 51 ausgewertet, da die interindividuelle Variabilität der Homogenatspender in dieser Arbeit nicht im Vordergrund stand. Für die Analyse wurden Rechtecke um die typisch formierten Banden auf Höhe von 37 - 45 kDa gezogen (Abbildung 2). Das Programm berechnete daraufhin unter Einbeziehung des lokalen Hintergrundes eine relative Signalintensität.

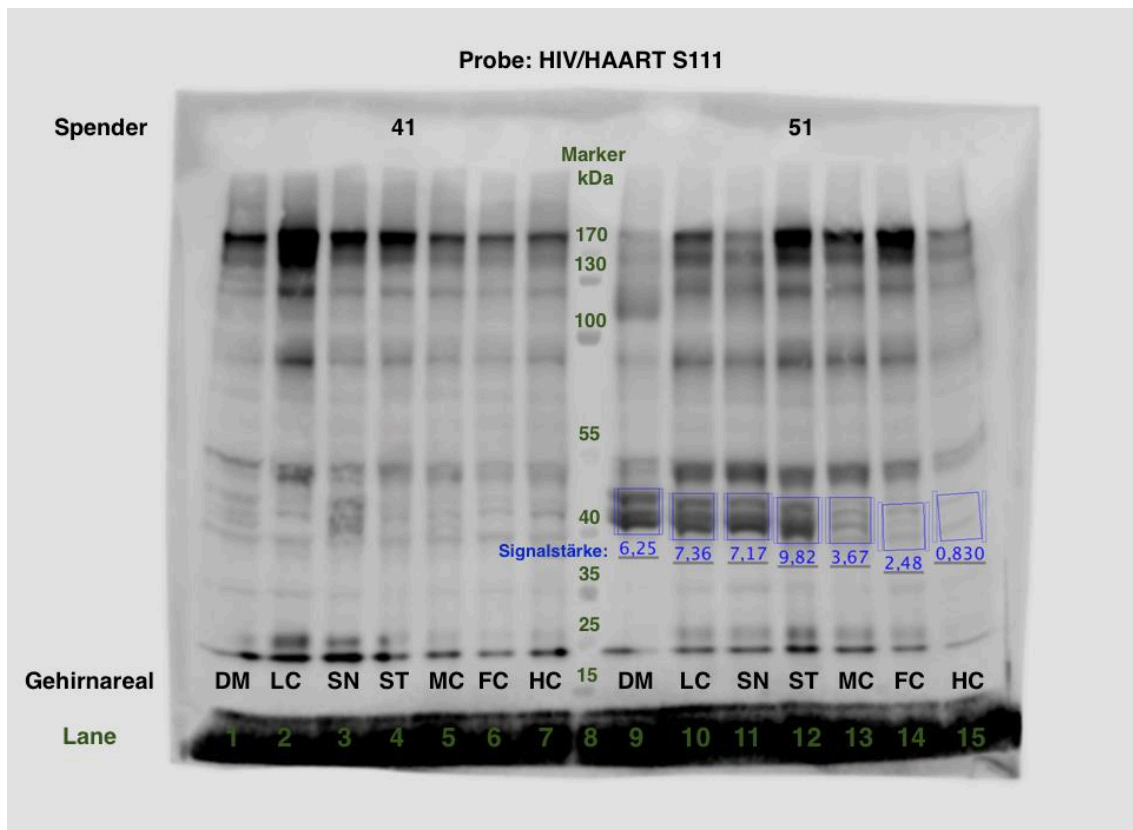


Abbildung 2 Beispielhafte Auswertung einer Membran mit Hilfe des Image Studio Programms

Der Größenstandard in kDa (Kilodalton) ist senkrecht in Grün eingetragen, die jeweilige Laufspur ist horizontal mit grüner Farbe markiert. Auf der linken Seite des Blots wurden die Gehirnhomogenate des Spenders Nr. 41 aufgetragen, auf der rechten Seite von Nr. 51. Aufgetragen wurden folgende Gehirnareale: DM (dorsaler Motornukleus des Nervus Vagus), LC (Locus Coeruleus und Locus Subcoeruleus), SN (Substantia Nigra), ST (Striatum), MC (temporaler Mesocortex), FC (first order sensory association areas) und HC (higher order sensory association areas). Diese Membran wurde mit dem Serum des HIV-Patienten oder der HIV-Patientin Nr. S111 inkubiert. In blau sind die vom Programm Image Studio errechneten Signalintensitäten eingetragen.

HAART = engl.: highly active antiretroviral therapy

Methoden

3.3.6 Bestimmung der Banden

Die Banden um 37-49 kDa wurden ausgewählt, weil dieses Cluster auf nahezu allen Membranen besonders deutlich erkannt wurde. Das molekulare Gewicht von GFAP beträgt 50 kDa (100), bei den anderen Banden handelt es sich wahrscheinlich um Zerfallsprodukte (100) oder Isoformen (101) von GFAP. Auch Dr. rer. nat. Gschmack, ebenfalls Mitglied der Arbeitsgruppe von Prof. Scheller, hat gezeigt, dass es sich bei den Proteinen auf diesen Bandenhöhen am wahrscheinlichsten um GFAP und seine Isoformen handelt (99). Die Proteinidentifikation dieser Banden fand damals mittels Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (nano HPLC-MS) durch die Firma Proteome Factory AG statt (99). Außerdem wurden im Rahmen von Vorexperimenten zu der hier vorliegenden Promotion die Membranen von Dr. Gschmack gestrippt und mit einem Anti-GFAP-Antikörper (Goat pAb to GFAP, 1:5000, abcam ab53554) erneut inkubiert. Als zweiter Antikörper diente ein Rabbit Anti-Goat IgG (HRP, 1:5000, abcam ab6741). Die Auswertung nach ECL-Farbkubation mit dem Odyssey Imaging System zeigte ebenfalls eine hohe Signalintensität der Banden um 37 – 50 kDa.

3.3.7 Übersicht der erstellten Western Blots

Es wurden insgesamt 35 Membranen erstellt, davon wurden 23 Membranen mit dem Serum von PLWH und 12 mit dem Blut von Kontrollen inkubiert (siehe Abbildung 3). Auf Grund von vorangegangenen Experimenten in der Arbeitsgruppe stand nicht die gleiche Menge Homogenat aus allen Arealen zur Verfügung. LC konnte daher nur für 16 Membranen verwendet werden, acht davon wurden mit HIV-Serum inkubiert und acht mit dem Serum von Mitgliedern der Kontrollgruppe. Gruppe 1 (HIV/HAART) setzt sich demnach wie folgt zusammen: 15 von 23 Membranen wurden lediglich mit sechs verschiedenen Gehirnarealen (DM, SN, ST, MC, FC, HC) geblottet und die restlichen acht Membranen mit sieben Arealen (DM, LC, SN, ST, MC, FC, HC). Gruppe 2 (Controls) besteht aus zwölf Membranen, acht Membranen wurden mit sieben Arealen (DM, LC, SN, ST, MC, FC, HC) geblottet und vier wurden ohne LC geblottet.

Methoden

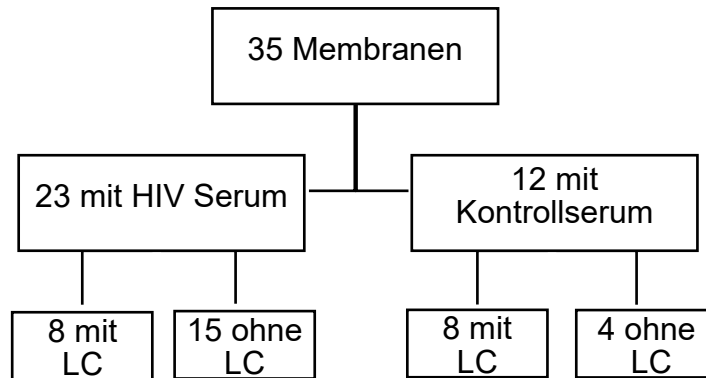


Abbildung 3 Übersicht: welche Membranen wurden wie erstellt?

Insgesamt wurden 35 Nitrocellulosemembranen mittels Gelelektrophorese und Western Blot hergestellt. 16 dieser Membranen wurden mit dem Gehirnhomogenat des Areals LC (Locus Coeruleus / Subcoeruleus) erstellt. Von diesen 16 Membranen wurden 8 mit HIV-Serum und 8 mit dem Serum der Kontrollgruppe inkubiert. 19 Membranen wurden ohne LC erstellt, 15 von ihnen wurden mit HIV-Serum und 4 mit Kontrollserum inkubiert.

3.4 HAND-1 Studie

Alle Daten in dieser Arbeit und die Blutproben stammen aus der HAND-1 Studie, die vom Bugando Medical Centre (BMC) der Catholic University of Health and Allied Sciences (CUHAS) in Kooperation mit der Julius-Maximilians-Universität Würzburg, der Tropenmedizinischen Abteilung der Missionsärztlichen Klinik Würzburg und dem Missionsärztlichem Institut Würzburg durchgeführt wurde. Das Bugando Medical Centre befindet sich in der Stadt Mwanza, am Ufer des Viktoriasees im Norden von Tansania.

Die HAND-1 Studie wurde am 8. Februar 2012 vom gemeinsamen CUHAS/ BMC Research Ethics and Review Committee zugelassen (Aktenzeichen: BREC/001/05/2012). Auch die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg hatte mit dem Schreiben vom 12. Juni 2012 keine ethischen oder rechtlichen Einwände gegen die Auswertung der Proben durch das Würzburger Institut für Virologie und Immunbiologie ausgedrückt. Ziel der Querschnittsstudie war es die Prävalenz von HIV-assoziierten neurologischen Erkrankungen im Bugando Medical Centre zu erfassen und das Abschneiden von verschiedenen Studiengruppen bei neurokognitiven Tests miteinander zu vergleichen. Zu diesem Zwecke wurden die Teilnehmenden in drei Gruppen eingeteilt: PLWH unter Therapie (Gruppe 1), PLWH ohne Therapie aber mit mehr als 500 CD4+ Zellen pro μl (Gruppe 2) und HIV-negative Personen (Gruppe 3). Ausgeschlossen wurden Personen, die jünger als 18 oder älter als 60 Jahre

waren. Weiterhin wurden Personen mit aktuellen oder vergangenen Infektionen des ZNS oder solche mit psychischen Erkrankungen nicht zur Studie zugelassen.

3.5 Neurokognitive Tests

Die Durchführung der HAND-1 Studie und die Etablierung der neurokognitiven Testbatterie wird in der Diplomarbeit von Maria Scholler beschrieben (102). Die Weiterentwicklung und wissenschaftliche Auswertung der neurokognitiven Tests dieser Studie wurde im Rahmen der medizinischen Doktorarbeit von Laura Kersting durchgeführt (103). Für die Originale der Testunterlagen wird auf die Promotionsschrift von Frau Dr. Kersting verwiesen. Die Versuchspersonen wurden einer ganzen Reihe von standardisierten Tests ausgesetzt um möglichst viele verschiedene neurokognitiver Fähigkeiten zu prüfen. Die Testung fand in einer ruhigen Umgebung statt. Auf Grund von interkulturellen Unterschieden und funktionalem Analphabetismus unter den Teilnehmenden der Studie musste einige der Tests abgeändert werden. Die Untersuchungen fanden entweder auf Suaheli oder auf Englisch statt, Formulare und Unterlagen waren in beiden Sprachen vorhanden.

3.5.1 Mini Mental State Examination (MMSE)

Die Mini Mental State Untersuchung ist ein international standardisierter Test zum Demenzscreening. Er überprüft Aufmerksamkeit, Orientierung, Gedächtnis, Sprache und räumliches Vorstellungsvermögen (104).

Der Test wurde an die lokalen Gegebenheiten angepasst, unter anderem wurde er in zwei Teilen durchgeführt. Während des ersten Teils wurde die zeitliche (5 Punkte) und örtliche (5 Punkte) Orientierung ermittelt. Bei der Frage nach der Jahreszeit wurden auch die Antworten ‚Regenzeit‘ oder ‚Trockenzeit‘ als korrekt gewertet. Insgesamt konnten im ersten Teil des Tests zehn Punkte erreicht werden. Er diente als Einstieg in die Testsituation und sollte den Probanden die Eingewöhnung erleichtern (103).

Als nächstes wurde die IHDS abgefragt. Ein Teil der IHDS ist das Nennen von vier verschiedenen Begriffen und dem erneuten Abfragen dieser Begriffe nachdem andere Aufgabe erledigt werden mussten. Diese Gedächtnisprüfung ist ebenfalls Teil des MMSE. Um die Aufmerksamkeit der Probanden zu schonen

Methoden

und die Ergebnisse nicht zu verfälschen wurde ihnen diese Aufgabe nur einmal im Rahmen der IHDS gestellt (103). In dieser Doktorarbeit wurde die Aufgabe als Teil der IHDS gewertet und aus der Wertung des MMSE gestrichen.

Im zweiten Teil des MMSE mussten die Testpersonen zwei Objekte benennen (2 Punkte), einen Satz wiederholen (1 Punkt), Anweisungen befolgen (3 Punkte), einen Satz lesen und befolgen (1 Punkt), einen Satz schreiben (1 Punkt) und eine Zeichnung von zwei Fünfecken abzeichnen (1 Punkt). Insgesamt konnten sie neun Punkte erreichen. Im international standardisierten MMSE muss man außerdem noch ein Wort rückwärts buchstabieren (5 Punkte). In Anbetracht der sehr unterschiedlichen Bildung der Teilnehmenden wurde diese Aufgabe übersprungen. Außerdem musste der Test für die analphabetischen Teilnehmenden modifiziert werden (103).

In der hier vorgelegten Arbeit konnten im MMSE also insgesamt 19 Punkten erreicht werden. In der standardisierten Variante können 30 Punkte erreicht werden (104)

3.5.2 Internationale HIV Demenz Skala (IHDS)

Die internationale HIV Demenz Skala ist als Screeningmethode gedacht. Sie dient dazu Individuen mit einem erhöhten Risiko für eine HIV Demenz zu identifizieren. Überprüft werden das Gedächtnis, die motorische und die psychomotorische Geschwindigkeit. Der Test wurde für eine weltweite Nutzung entwickelt. Zuerst werden vier Begriffe genannt und von den Getesteten wiederholt. Dann werden die Teilnehmenden gebeten innerhalb von fünf Sekunden Daumen und Zeigefinger der nicht-dominanten Hand möglichst oft aneinander zu führen. Die nächste Aufgabe besteht darin, innerhalb von zehn Sekunden eine bestimmte Bewegungsabfolge mit der nicht-dominanten Hand möglichst oft zu wiederholen. Zum Schluss mussten die Probandinnen und Probanden die vier eingangs genannten Begriffe wiederholen. Für jede Aufgabe wurden maximal vier Punkte vergeben, folglich konnte man insgesamt zwölf Punkte erreichen.

Methoden

3.5.3 Verbal Fluency Test

Bei diesem Wortflüssigkeitstest werden exekutive und verbale Funktionen untersucht. Es mussten innerhalb von 60 Sekunden so viele Wörter aus der Kategorie Tiere wie möglich genannt werden. Die Anzahl der korrekten Antworten entsprach der Punktzahl.

3.5.4 Digit Span Test

Der Digit Span Test eruiert die Spanne des Arbeitsgedächtnisses. Den Teilnehmenden werden immer länger werdende Zahlenreihen vorgelesen, die sie im ersten Teil des Tests vorwärts und im zweiten Teil rückwärts wiedergeben sollen. Der erste Teil des Tests beginnt in Runde eins mit zwei Ziffern und endet in Runde acht mit neun Ziffern. Pro Runde hatte man zwei Versuche und pro Versuch konnte ein Punkt erzielt werden. Im ersten Teil konnte demnach maximal 16 Punkte erzielt werden. Der zweite Teil, in dem die Zahlenkolonne rückwärts wiedergegeben werden mussten, hatte sieben Runden. Somit konnten maximal 14 Punkte erreicht werden. Insgesamt konnten im Digit Span Test 30 Punkte verdient werden.

3.5.5 Pegboard Test

Der 9-Loch-Pegboard Test soll die Feinmotorik und insbesondere die Handgeschicklichkeit messen. Das Pegboard ist eine Platte mit neun Löchern, die in einem Quadrat angeordnet sind (siehe Abbildung 4). In vielen Fällen hat die Platte außerdem noch eine kleine Mulde, in der die Stifte liegen. Die Teilnehmenden müssen diese Stifte so schnell sie können in die Löcher auf der Platte stecken. Dieser Test wurde mit jeder Hand zwei Mal durchgeführt, wobei nur der zweite Versuch gestoppt und gewertet wurde.



Abbildung 4 Schemazeichnung eines 9-Loch-Pegboards; eigene Darstellung

3.5.6 Trail Making Test (TMT)

Der Trail Making Test kann Defizite der Aufmerksamkeit, der exekutiven Funktionen und visuell-motorischen Geschwindigkeit aufzeigen (105). Die Zahlen von eins bis fünfundzwanzig stehen, zufällig angeordnet, auf einem Blatt Papier. Für Teil A des Tests wurden die Testpersonen gebeten die Zahlen in aufsteigender Reihenfolge miteinander zu verbinden. Bei Teil B war jede Zahl in doppelter Ausführung vorhanden, einmal alle Zahlen bis fünfundzwanzig in Gelb und einmal in Rosa. Die Testpersonen sollten die Zahlen nun abermals in aufsteigender Reihenfolge verbinden, dabei sollten die Farben jedoch immer abwechselnd vorkommen. Die Zeit bis zur Vollendung der Aufgabe wurde gestoppt. Vor beiden Teilen des Tests bestand die Möglichkeit das Vorgehen einmalig zu üben.

Tabelle 4 Übersicht der neurokognitiven Tests und geprüften Fähigkeiten

Neurokognitiver Test	Fähigkeiten
Mini Mental State Examination	Aufmerksamkeit, Orientierung, Gedächtnis, Sprache und räumliches Vorstellungsvermögen
International HIV Dementia Scale	Gedächtnis, motorische und psychomotorische Geschwindigkeit
Verbal Fluency Test	exekutive und verbale Funktionen
Digit Span Test	Arbeitsgedächtnisspanne
Pegboard Test	Motorik, Feinmotorik und Handgeschicklichkeit
Trail Making Test	Aufmerksamkeit, exekutiven Funktionen und visuell-motorischen Geschwindigkeit

3.5.7 International Activities of Daily Life (IADL)

Für die Einteilung von HIV-assoziierten neurologischen Erkrankungen (HAND) in *asymptomatic neurocognitive impairment* (ANI), *mild neurocognitive disorders* (MND) und *HIV-associated dementia* (HAD) sind Einschränkungen der Alltagsaktivitäten entscheidend. Um die Funktionsfähigkeit der Teilnehmenden im Alltag zu erforschen wurde in der HAND-1 Studie der International Activities of Daily Life Fragebogen eingesetzt. Der IADL enthält Fragen zu Alltagsfähigkeiten in den Bereichen Telefonieren, Einkaufen, Kochen, Haushalt, Wäsche, Transport, Medikamente, Garten- bzw. Feldarbeit, soziale Kontakte und Finanzen.

3.6 Statistische Datenanalyse

Die Daten der neurokognitiven Testbatterie und der Western Blots wurden mit Hilfe der Programme Prism und SPSS analysiert. Neben den statistischen Analysen konnte auch eine grafische Darstellung der Ergebnisse durch die Programme erfolgen. Korrelationen zwischen Datensätzen wurden mit Hilfe der linearen Korrelationsanalyse untersucht. Der Korrelationskoeffizient r wurde nach Cohen (106) folgendermaßen interpretiert: $r = 0,1$ gilt als schwache Korrelation, $r = 0,3$ als moderate Korrelation und $r = 0,5$ als starke Korrelation. Ein $p < 0.05$ in der linearen Regressionanalyse wurde als statistisch signifikant

Methoden

gewertet. Gruppenbezogene Wertemengen wurden mit Hilfe der Analyse von D'Agostino Pearson auf Normalverteilung überprüft. Da für alle zu vergleichenden Gruppen mindestens eine der Gruppen nicht-normalverteilt war, wurden im Folgenden Tests für nicht-normalverteilte Werte benutzt. Um zu untersuchen, ob sich die Wertemengen der einzelnen Gruppen statistisch signifikant voneinander unterscheiden (Signifikanzniveau $p < 0.05$) wurden der Mann-Whitney U-test (für den Vergleich von zwei Gruppen) bzw. der Kruskal-Wallis-Test (für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen) gewählt.

4. Ergebnisse

4.1 Epidemiologische Merkmale der Studienteilnehmenden

Insgesamt wurden für die hier vorliegende Promotion die Blutproben von 35 zufällig ausgewählten Teilnehmenden der HAND-1 Studie untersucht. Sie wurden in zwei Gruppen eingeteilt: Gruppe 1 bestand aus 23 HIV-positiven unter ART und Gruppe 2 war die Kontrollgruppe mit 12 HIV-negativen Teilnehmenden. Ein Alter von über 60 Jahren oder unter 18 Jahren war ein Ausschlusskriterium für die HAND-1 Studie. Das Durchschnittsalter aller Teilnehmenden dieser Arbeit lag bei 36 Jahren, die jüngste Person war bei Probenentnahme 19 Jahre alt und der Älteste 58 Jahre. Der Frauenanteil lag bei 66 %. Außerdem wurde das ‚Bildungsniveau‘ der Teilnehmenden erhoben. Dazu wurde erfragt, wie lange die Menschen primäre, sekundäre und tertiäre Bildungsanstalten besucht hatten und das Ergebnis als ‚Bildungsjahre‘ festgehalten (siehe Abbildung 5). Unter den 35 Teilnehmenden dieser Arbeit hatten 14 % niemals eine Schule besucht, eine Person konnte 16 Bildungsjahre vorweisen. Der Durchschnitt lag bei 6,7 Jahren.

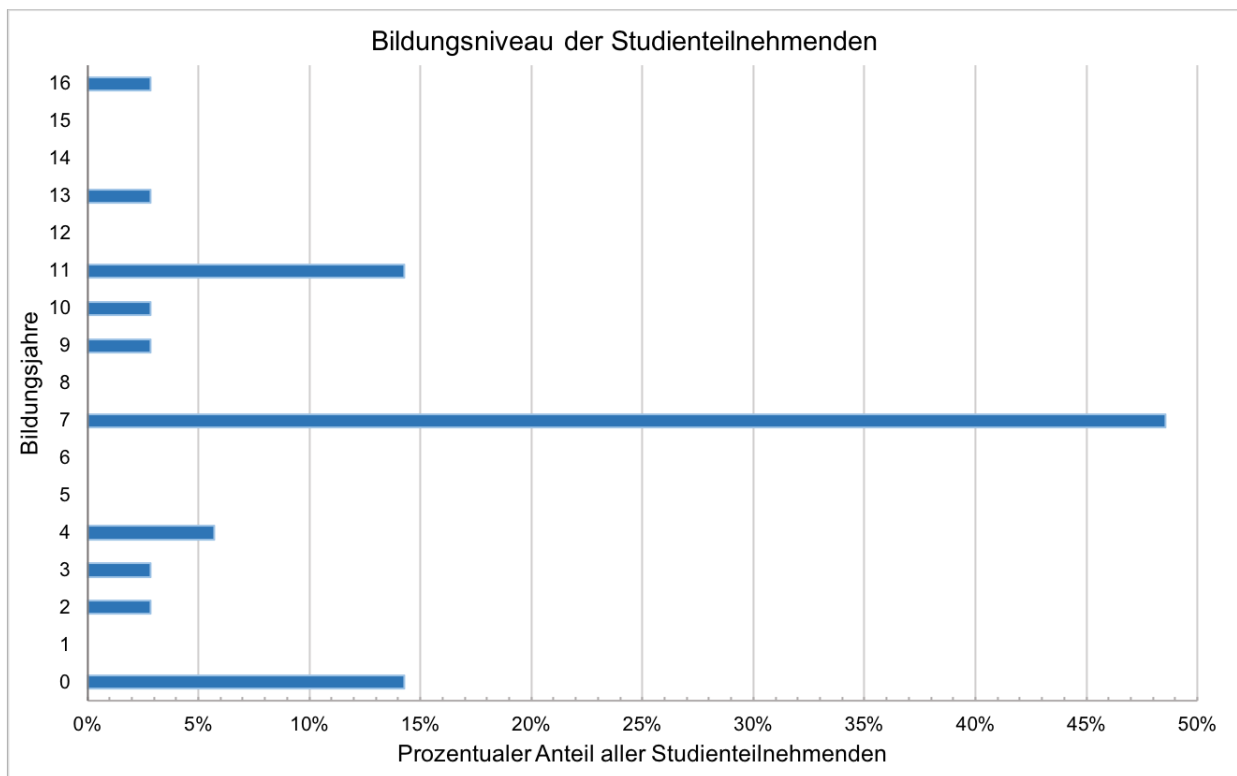
Tabelle 5 Charakteristische Merkmale der Studiengruppen

HAND-1 Studie		
	Gruppe 1: HIV & ART	Gruppe 2: Kontrollen
Teilnehmende	23	12
Geschlecht	w: 16, m: 7	w: 7, m: 5
Alter (Mittelwert ± Standardabweichung)	40,00 ± 7,97 Jahre	29,83 ± 9,85 Jahre
Bildungsjahre (Mittelwert ± Standardabweichung)	6,09 ± 3,26 Jahre	7,92 ± 4,48 Jahre

In dieser Tabelle werden einige epidemiologische Daten (Alter, Geschlecht, Bildungsstand) der Teilnehmenden gezeigt. Alter und Bildungsstand sind in beiden Gruppen ähnlich verteilt, in der Therapiegruppe (HIV&ART) fanden sich mehr Frauen. ART = antiretrovirale Therapie; HAND = engl. HIV-associated neurocognitive disorders; m = männlich; w = weiblich

Ergebnisse

Abbildung 5 Bildungsjahre der Teilnehmenden



Die Bildungsjahre der 35 Teilnehmenden dieser Arbeit wurden erfasst und auf der y-Achse aufgetragen. Die x-Achse zeigt den prozentualen Anteil der 35 Studienteilnehmenden. Die durchschnittliche Menge an Bildungsjahren betrug 6,7 Jahre (Mittelwert). Es zeigt sich, dass 14 % der Testpersonen keine Schulbildung hatten.

Laura Kersting errechnete in ihrer Promotion die Prävalenz von neurokognitiven Störungen unter Teilnehmenden der HAND-1 Studie (103). Die Ergebnisse der neurologischen Testbatterie der Kontrollgruppe diente als Normwerte (103). Die Einteilung in *asymptomatic neurocognitive impairment* (ANI), *mild neurocognitive disorder* (MND) und *HIV-associated dementia* erfolgte nach der Definition von Antinori (66). Unter den 101 Mitgliedern der HIV/HAART-Gruppe konnten etwa 55 % als ANI und 39 % als MND klassifiziert werden (103). Unter den Teilnehmenden litt niemand an HIV-assoziiertes Demenz (103).

4.2 Auswertung der Western Blots

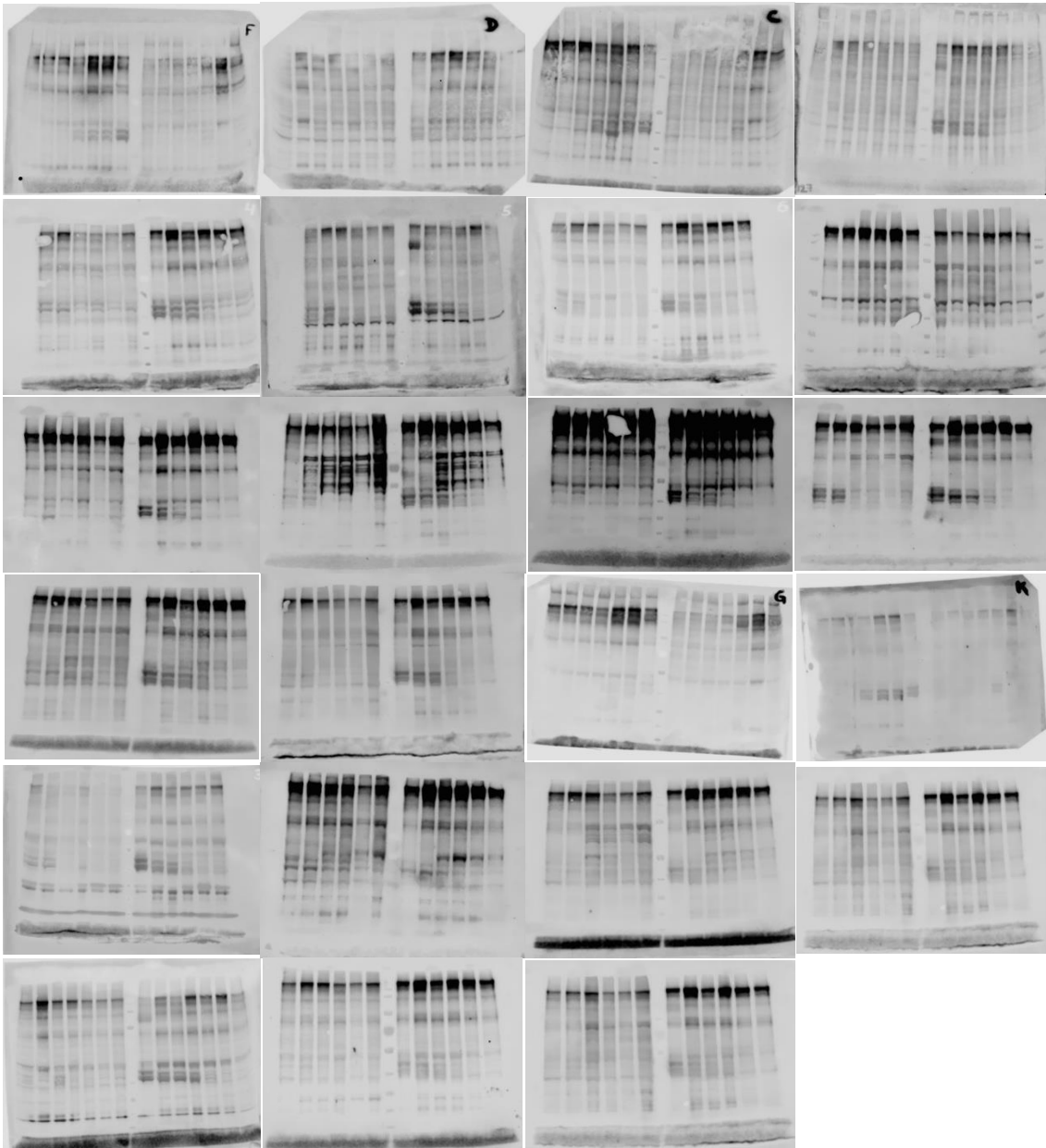
Um festzustellen ob GFAP-Autoantikörper bei PLWH oder Kontrollen vorkommen wurden Membranen hergestellt, auf die Gehirnhomogenate und das in ihnen enthaltene saure Gliafaserprotein geblottet wurde. Das Serum von Patienten und Patientinnen bzw. von Kontrollen war der erste Antikörper mit dem die Membranen inkubiert wurden. Der zweite Antikörper, ein Anti-Human IgG-Antikörper (Goat, HRP, 1:50000), diente der Detektion des Erstantikörpers. Die

Ergebnisse

Erfassung der Signalintensität nach ECL-Farbinkubation gelang mit Hilfe der Kamera des Odyssey Fc Dual-Mode Imaging Systems (Li-Cor). Die semiquantitative Bestimmung der Signale wurde mit der zur Kamera gehörenden Software von Li-Cor durchgeführt.

Abbildung 6 zeigt eine Übersicht von allen Western Blot Membranen. Es wird deutlich, dass bei beiden Studiengruppen Signale gegen alle Hirnareale gemessen werden konnten. Es besteht eine ubiquitäre Autoreaktivität gegen den getesteten Arealen.

Gruppe 1 (HIV/HAART)



Ergebnisse

Gruppe 2 (Kontrollen)

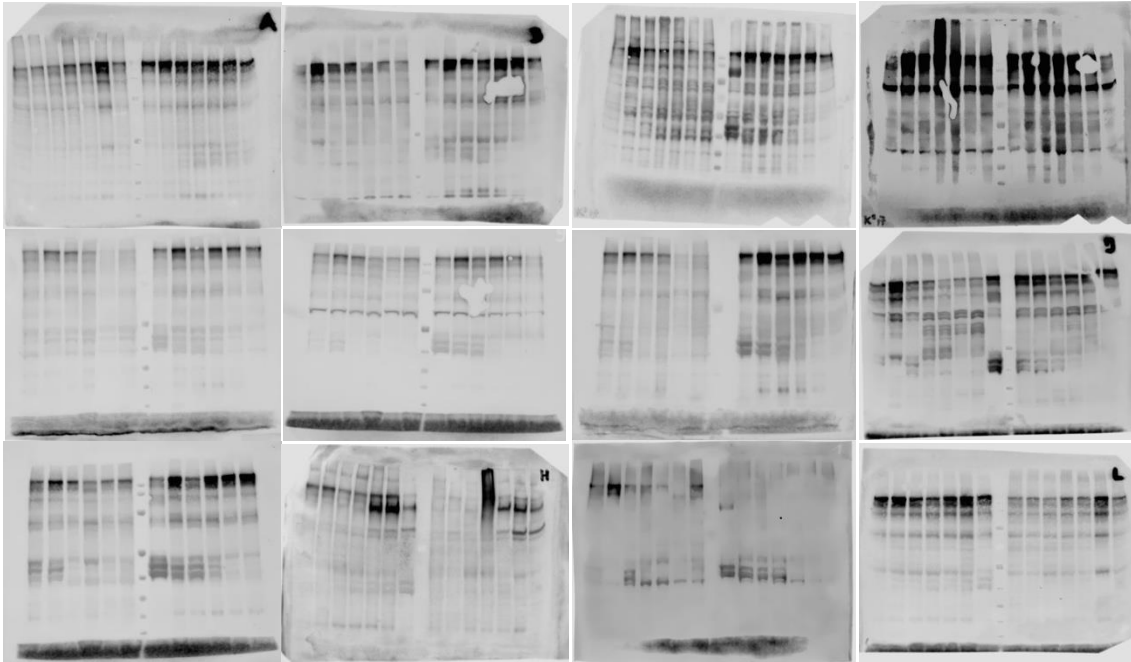


Abbildung 6 Übersicht: alle WB-Membranen der beiden Gruppen

Alle Western Blot Membranen wurden mit den Gehirnhomogenaten von zwei neurologisch gesund verstorbenen Spendern erstellt. Das Serum von Patienten und Patientinnen (Gruppe 1) bzw. von Kontrollen (Gruppe 2) war der erste Antikörper mit dem die Membranen inkubiert wurden. Der zweite Antikörper war ein Goat Anti-Human IgG Antikörper (1:50000). Semiquantitative Bestimmung der Signalintensität nach ECL-Farbinkubation (ECL = engl. enhanced chemiluminescence) mit Hilfe der Kamera des Odyssey Fc Dual-Mode Imaging Systems (Li-Cor). Bei beiden Gruppen besteht eine Autoreaktivität gegen alle Gehirnareale.

Bei genauerer Betrachtung fallen die Banden bei 37 bis 45 kDa ins Auge, insbesondere im DM-Areal (siehe Abbildung 7 und Abbildung 2 auf S. 28). Diese Banden wurden in Vorexperimenten als GFAP spezifisch identifiziert und daher auf allen Membranen und in allen Arealen ausgewertet.

Ergebnisse

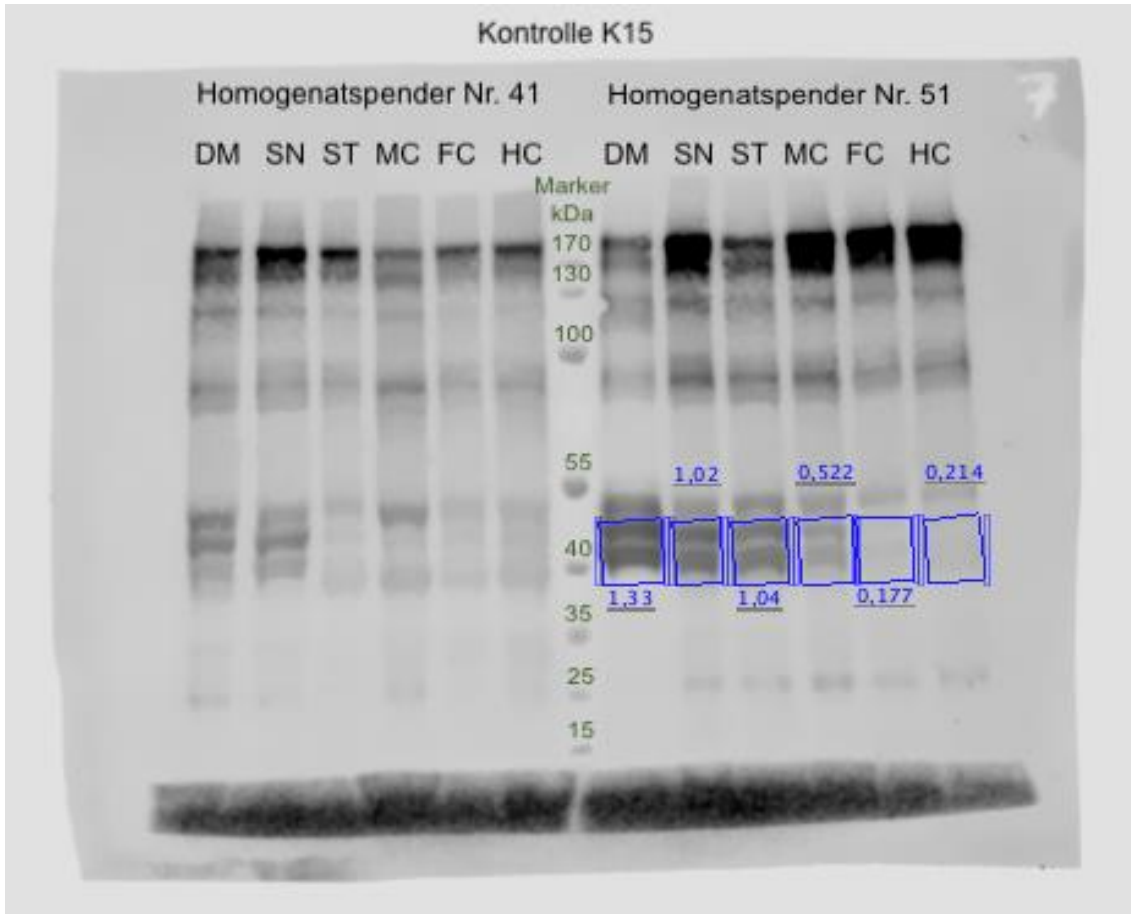


Abbildung 7 Detailansicht einer Membran der Kontrollgruppe

Die Membran wurde mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot hergestellt. Der erste Antikörper war das Serum eines Mitgliedes der Kontrollgruppe (K15), der zweite war ein Mäuse-IgG-Ak (HRP, 1:50000). Es wurden folgende Gehirnareale auf die Membranen geblottet: DM (dorsaler Motornukleus des Nervus Vagus), SN (Substantia Nigra), ST (Striatum), MC (temporaler Mesocortex), FC (first order sensory association areas) und HC (higher order sensory association areas). In grün wurde der Größenstandard in kDa (Kilodalton) eingetragen, in blau die mittels Image Studio von Li-Cor berechnete Signalintensität. Die blau markierten Banden von DM, SN und ST fallen durch ihre Signalintensität besonders auf.

4.2.1 Signifikante Unterschiede in der GFAP-Antikörper Signalintensität der verschiedenen Gehirnareale

Zunächst sollte untersucht werden, ob Unterschiede in der GFAP-Autoantikörper Signalintensität zwischen den einzelnen Gehirnarealen bestehen. Zu diesem Zweck wurden alle gemessenen Signale eines Areals gepoolt und mit denen der anderen Areale verglichen. Die zentrale Tendenz der Areale wurde mittels Kruskal-Wallis Test verglichen, es wurden signifikante Unterschiede ($p < 0,0001$) zwischen den Gruppen (siehe Abbildung 8A) gefunden. Diese Unterschiede wurden daraufhin mit dem Dunn Post Test analysiert.

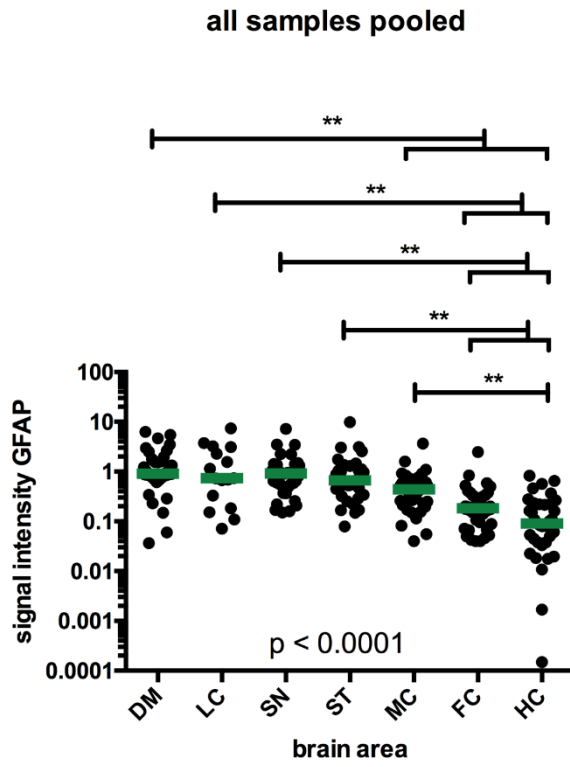
Ergebnisse

Die Signale des DM-Areals von allen Studienteilnehmenden sind tendenziell stärker als die Signale der Areale MC, FC und HC (siehe Abbildung 8A). Die Signale, die in den LC-, SN- und ST-Arealen gemessen wurden sind ebenfalls signifikant stärker als die Signale von FC und HC. Die Signale von MC unterscheiden sich nur noch von denen, die bei HC gemessen wurden. Diese Unterschiede in der zentralen Tendenz bleiben bestehen, wenn man nur die Signalstärken der Kontrollen ($p < 0,0001$, siehe Abbildung 8B) oder nur die der HIV/HAART-Gruppe ($p < 0,0001$, siehe Abbildung 8C) betrachtet. Bei der Kontrollgruppe bestehen die Unterschiede insbesondere zwischen DM und FC ($p < 0,05$), sowie zwischen DM und HC ($p < 0,001$). Weiterhin unterscheidet sich LC von HC ($p < 0,05$), SN von HC ($p < 0,01$) und ST von HC ($p < 0,01$). Bei der HIV/HAART Gruppe wird DM signifikant stärker erkannt als MC ($p < 0,05$), FC ($p < 0,0001$) und HC ($p < 0,0001$). LC unterscheidet sich signifikant von FC ($p < 0,05$) und HC ($p < 0,01$). SN unterscheidet sich signifikant von FC ($p < 0,0001$) und HC ($p < 0,0001$). ST unterscheidet sich signifikant von FC ($p < 0,01$) und HC ($p < 0,0001$).

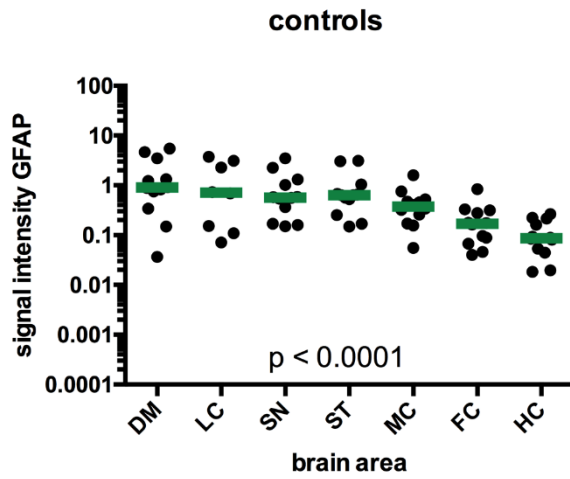
Folglich lässt sich feststellen, dass die GFAP-Autoantikörper Signalintensität sich je nach Gehirnareal unterscheidet. In beiden Gruppen bestehen signifikante Unterschiede zwischen den Arealen, insbesondere die DM-Signale sind signifikant stärker als die der kortikalen Areale. Die hier beobachtete Verteilung der GFAP-Intensitäten in unterschiedlichen Gehirnarealen konnte von uns auch in einer größeren Studie mit Seren von Gesunden beobachtet werden. Die besonders stark GFAP-positiven Areale sind diejenigen, die bei subkortikalen Demenzen wie Morbus Parkinson oder HAND besonders früh geschädigt werden. Eine GFAP-bedingte Autoimmunantwort könnte also an dem Pathomechanismus dieser Erkrankungen beteiligt sein. Diese Ergebnisse wurden von unserer Arbeitsgruppe ebenfalls veröffentlicht, und die Autorin der hier vorliegenden Doktorarbeit hat in dieser Veröffentlichung eine Koautorschaft (107).

Ergebnisse

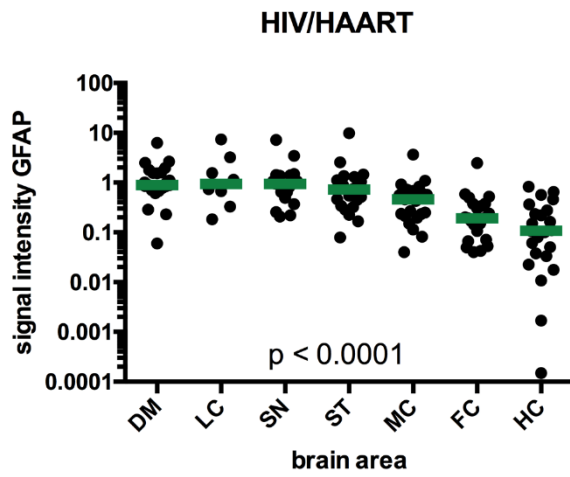
A



B



C



Ergebnisse

Abbildung 8 Signifikante Unterschiede in der GFAP-Antikörper Signalintensität der verschiedenen Gehirnareale

Alle Western Blots wurden mit den Gehirnhomogenaten desselben neurologisch gesund verstorbenen Spenders (Nr. 51) erstellt. Das Serum von Patienten und Patientinnen unter antiretroviraler Therapie (HIV/HAART, C) bzw. von Kontrollen (controls, B) war der erste Antikörper mit dem die Membranen inkubiert wurden. Der zweite Antikörper war ein Goat Anti-Human IgG Antikörper (HRP, 1:50000). Semiquantitative Bestimmung der Signalintensität nach Farbkubation mit ECL-Substrat (ECL = engl. enhanced chemiluminescence). Analyse der zentralen Tendenz der Verteilung mittels Kruskal-Wallis Test. Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden mittels Post-hoc Test (Dunn's Test) untersucht. Mediane der Gruppen wurden mit einer grünen Markierung gekennzeichnet. $p < 0,05$ gilt als signifikant. * gilt als signifikant und entspricht einem p Wert von $0,01 - 0,05$. ** gilt als sehr signifikant und entspricht einem p Wert von $0,001 - 0,01$. *** gilt als höchst signifikant und entspricht einem p Wert von $0,0001 - 0,001$. **** gilt ebenfalls als höchst signifikant und entspricht einem p Wert $< 0,0001$.

DM = dorsaler Motornukleus des N. Vagus, LC = Locus Coeruleus / Subcoeruleus, SN = Substantia Nigra, ST = Striatum, MC = temporaler Mesocortex, FC = first order sensory association areas, HC = higher order sensory association areas.

A Die logarithmierten Signalintensitäten der im Serum von PLWH **und** Kontrollen enthaltenen GFAP-Antikörper werden, nach Gehirnareal aufgetrennt, dargestellt. Im Kruskal-Wallis Test zeigt sich ein signifikanter Unterschied in der zentralen Tendenz der Signalintensitäten der einzelnen Gehirnareale ($p < 0,0001$). Die Ergebnisse des Dunn Tests werden durch Balken über dem Diagramm verdeutlicht. Die Signalstärken von DM unterscheiden sich signifikant von den Signalstärken von MC (**), FC (****) und HC (****). Ein signifikanter Unterschied besteht ebenfalls in den Signalstärken von LC und FC (**) bzw. LC und HC (****). Die Signale von SN unterscheiden sich signifikant von FC (****) und HC (****). Die Signale von ST unterscheiden sich signifikant von FC (****) und HC (****). Die Signale von MC unterscheiden sich signifikant von HC (**).

B Die logarithmierten Signalintensitäten der im Serum von Kontrollen enthaltenen GFAP-Antikörper werden dargestellt. Der Kruskal-Wallis Test lässt auf einen signifikanten Unterschied in der zentralen Tendenz der gepoolten Signalintensitäten der einzelnen Gehirnareale ($p < 0,0001$) schließen. Der Post-hoc Test zeigte, dass signifikante Unterschiede zwischen DM und FC (*), sowie zwischen DM und HC (***) bestehen. Weiterhin unterscheidet sich LC von HC (*), SN von HC (**) und ST von HC (**).

C Die logarithmierten Anti-GFAP-Signalintensitäten aller HIV-Patienten und -Patientinnen werden, nach Gehirnareal getrennt, dargestellt. Im Kruskal-Wallis Test zeigt sich ein signifikanter Unterschied in der zentralen Tendenz der Signalintensitäten der einzelnen Gehirnareale ($p < 0,0001$). Der Dunn Test verdeutlicht, dass sich DM signifikant von MC (*), FC (****) und HC (****) unterscheidet. LC unterscheidet sich signifikant von FC (*) und HC (**). SN unterscheidet sich signifikant von FC (****) und HC (****). ST unterscheidet sich signifikant von FC (**) und HC (****).

4.2.2 Keine signifikanten Unterschiede der GFAP-Antikörper Signalintensität von PLWH und Kontrollen

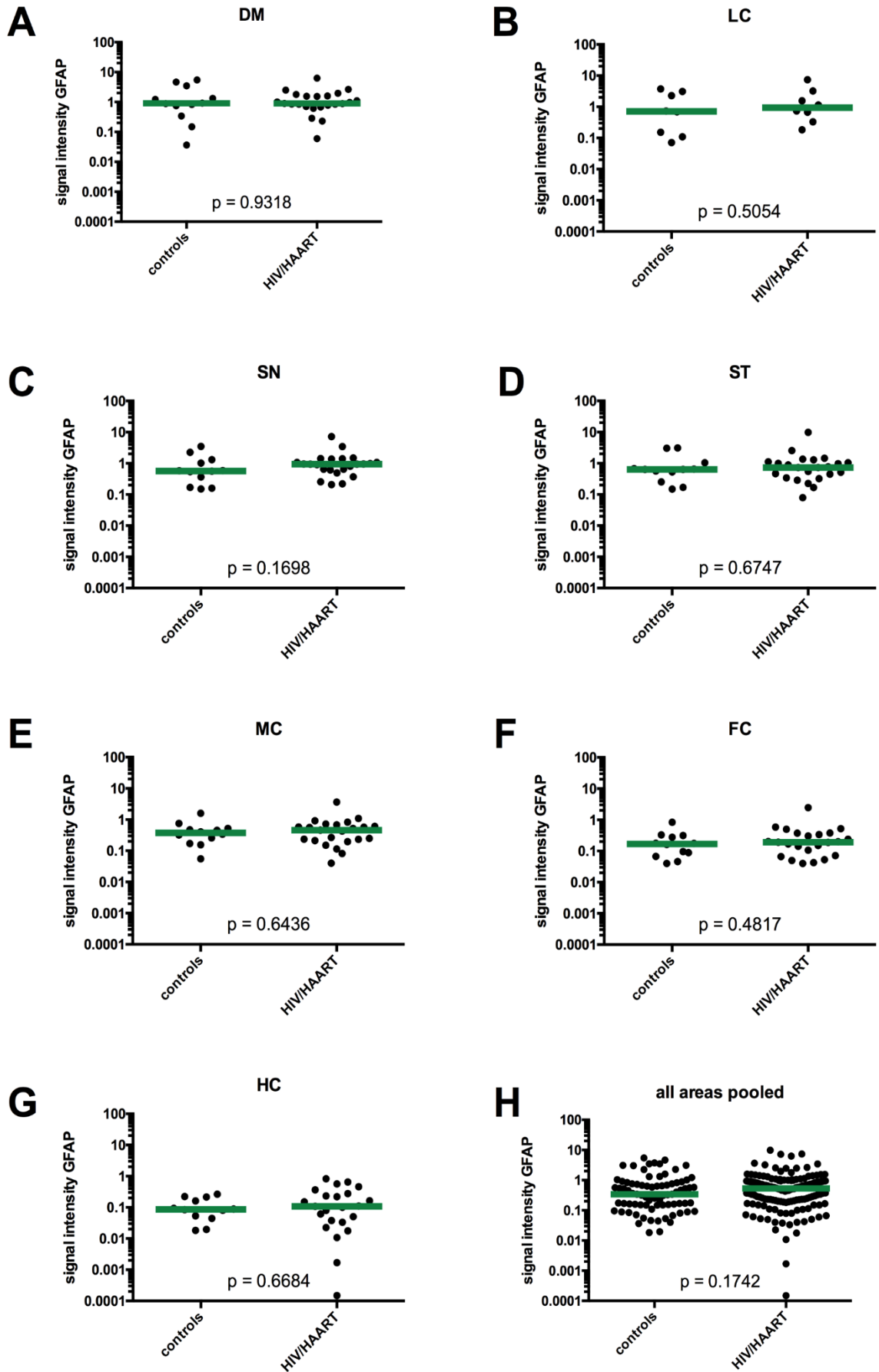
Als nächstes sollte eruiert werden ob es Unterschiede in der Antikörper-Signalstärke zwischen den beiden Studiengruppen gibt. Zu diesem Zwecke wurde die Reaktivität gegen jedes einzelne Areal von Gruppe 1 (HIV/HAART, $n = 23$) mit der Reaktivität von Gruppe 2 (controls, $n = 12$) verglichen (siehe Abbildung 9A-G). Zum Schluss folgte ein Vergleich aller Areale von allen Membranen einer Gruppe mit den gepoolten Signalstärken der Areale der anderen Gruppe (siehe Abbildung 9H). Die statistische Analyse fand mittels Mann-Whitney-U Test statt.

Ergebnisse

Die Gegenüberstellung der logarithmierten Signalintensitäten der DM-Areale (siehe Abbildung 9A) der beiden Gruppen lässt darauf schließen, dass sich die Signalstärken von HIV-Patientinnen und Patienten (Median = 0,8950) und Mitgliedern der Kontrollgruppe (Median = 0,9025) nicht signifikant voneinander unterscheiden ($p = 0,9318$). Es konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der zentralen Tendenz der Signalintensität von PLWH und Kontrollen in den Arealen LC (siehe Abbildung 9B, $p = 0,5054$), SN (siehe Abbildung 9C, $p = 0,1698$), ST (siehe Abbildung 9D, $p = 0,6747$), MC (siehe Abbildung 9E, $p = 0,6436$), FC (siehe Abbildung 9F, $p = 0,4817$) und HC (siehe Abbildung 9G, $p = 0,6684$) festgestellt werden. Vergleicht man alle Signale von allen Areale der Kontrollgruppe (Median = 0,3395) mit denen der HIV/HAART-Gruppe (Median = 0,5335) lässt sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der zentralen Tendenz der Verteilung feststellen (siehe Abbildung 9H, $p = 0,1742$).

Demnach lässt sich aus diesen Daten nicht ableiten, ob sich die Signalstärke der GFAP-Autoantikörper zwischen Menschen mit HIV und Mitgliedern der Kontrollgruppe signifikant unterscheidet.

Ergebnisse



Ergebnisse

Abbildung 9 Keine signifikanten Unterschiede in der GFAP-Antikörper Signalintensität von PLWH und Kontrollen

Alle Western Blots wurden mit den Gehirnhomogenaten desselben neurologisch gesund verstorbenen Spenders (Nr. 51) erstellt. Das Serum von Patienten und Patientinnen unter antiretroviraler Therapie (HIV/HAART) bzw. von Kontrollen (controls) war der erste Antikörper mit dem die Membranen inkubiert wurden. Der zweite Antikörper war ein Goat Anti-Human IgG Antikörper (HRP, 1:50000). Semiquantitative Bestimmung der Signalintensität nach Farbkubation mit ECL-Substrat (ECL = engl. enhanced chemiluminescence). Analyse der Unterschiede in der zentralen Tendenz der Verteilung zwischen den beiden Gruppen wurden mittels Mann-Whitney-U Test berechnet. Alle angegebenen p Werte sind zweiseitig, $p < 0,05$ gilt als signifikant. Mediane der Gruppen wurden mit einer grünen Markierung gekennzeichnet. DM = dorsaler Motornukleus des N. Vagus, LC = Locus Coeruleus / Subcoeruleus, SN = Substantia Nigra, ST = Striatum, MC = temporaler Mesocortex, FC = first order sensory association areas, HC = higher order sensory association areas.

A Gegenüberstellung der logarithmierten Signalintensitäten des DM-Areals von Kontrollen (controls, $n = 12$) und HIV-Patienten/-Patientinnen (HIV/HAART, $n = 23$). Der Mann-Whitney Test lässt darauf schließen, dass sich die Signalstärken von HIV/HAART (Median = 0,8950) und controls (Median = 0,9025) nicht signifikant voneinander unterscheiden (Mann-Whitney-U = 135, $p = 0,9318$).

B Gegenüberstellung der logarithmierten Signalintensitäten des LC-Areals von Kontrollen ($n = 8$) und HIV-Patienten/-Patientinnen ($n = 8$). Der Mann-Whitney Test lässt darauf schließen, dass sich die Signalstärken von HIV/HAART (Median = 0,9375) und controls (Median = 0,7110) nicht signifikant voneinander unterscheiden (Mann-Whitney-U = 25, $p = 0,5054$).

C Gegenüberstellung der logarithmierten Signalintensitäten des SN-Areals von Kontrollen (controls, $n = 12$) und HIV-Patienten/-Patientinnen (HIV/HAART, $n = 23$). Der Mann-Whitney Test lässt darauf schließen, dass sich die Signalstärken von HIV/HAART (Median = 0,9380) und controls (Median = 0,5685) nicht signifikant voneinander unterscheiden (Mann-Whitney-U = 98, $p = 0,1698$).

D Gegenüberstellung der logarithmierten Signalintensitäten des ST-Areals von Kontrollen (controls, $n = 12$) und HIV-Patienten/-Patientinnen (HIV/HAART, $n = 23$). Der Mann-Whitney Test lässt darauf schließen, dass sich die Signalstärken von HIV/HAART (Median = 0,7300) und controls (Median = 0,6360) nicht signifikant voneinander unterscheiden (Mann-Whitney-U = 125,5, $p = 0,6747$).

E Gegenüberstellung der logarithmierten Signalintensitäten des MC-Areals von Kontrollen (controls, $n = 12$) und HIV-Patienten/-Patientinnen (HIV/HAART, $n = 23$). Der Mann-Whitney Test lässt darauf schließen, dass sich die Signalstärken von HIV/HAART (Median = 0,4600) und controls (Median = 0,3730) nicht signifikant voneinander unterscheiden (Mann-Whitney-U = 124, $p = 0,6436$).

F Gegenüberstellung der logarithmierten Signalintensitäten des FC-Areals von Kontrollen (controls, $n = 12$) und HIV-Patienten/-Patientinnen (HIV/HAART, $n = 23$). Der Mann-Whitney Test lässt darauf schließen, dass sich die Signalstärken von HIV/HAART (Median = 0,1920) und controls (Median = 0,1695) nicht signifikant voneinander unterscheiden (Mann-Whitney-U = 117, $p = 0,4817$).

G Gegenüberstellung der logarithmierten Signalintensitäten des HC-Areals von Kontrollen (controls, $n = 12$) und HIV-Patienten/-Patientinnen (HIV/HAART, $n = 23$). Der Mann-Whitney Test lässt darauf schließen, dass sich die Signalstärken von HIV/HAART (Median = 0,1080) und controls (Median = 0,08685) nicht signifikant voneinander unterscheiden (Mann-Whitney-U = 125, $p = 0,6684$).

H Gegenüberstellung der logarithmierten Signalintensitäten aller Areale von Kontrollen (controls, $n = 80$) und HIV-Patienten/-Patientinnen (HIV/HAART, $n = 146$). Der Mann-Whitney Test lässt darauf schließen, dass sich die gepoolten Signalstärken aller Areale von HIV/HAART (Median = 0,5335) nicht signifikant von denen der controls (Median = 0,3395) unterscheiden (Mann-Whitney-U = 5201, $p = 0,1742$).

Ergebnisse

4.3 Korrelation der neurokognitiven Tests mit den GFAP-Antikörper Signalintensitäten

Vermeehrt vorkommende GFAP-Antikörper können ein indirekter Hinweis auf den Untergang von Astrozyten sein. Um der Frage nachzugehen, ob das Vorhandensein oder die Menge von GFAP-Autoantikörpern mit dem Abschneiden bei neurokognitiven Tests zusammenhängt, wurden die Signalintensitäten der GFAP-spezifischen Banden mit den Ergebnissen der neurokognitiven Tests korreliert. Für alle Variablen außer den Trail Making Test (TMT) wurde die Korrelation nach Spearman berechnet. Die Ergebnisse des TMT wurden nach Pearson berechnet, da sie die Voraussetzungen für diese Berechnung erfüllten. Der Korrelationskoeffizient r wurde nach Cohen (106) folgendermaßen interpretiert: $r = 0,1$ gilt als schwache Korrelation, $r = 0,3$ als moderate Korrelation und $r = 0,5$ als starke Korrelation.

4.3.1 Studiengruppe 1 (HIV/HAART)

Tabelle 6 zeigt die Ergebnisse der Korrelationen für Studiengruppe 1.

Tabelle 6 Korrelationen HIV/HAART-Gruppe

HIV / HAART		DM	LC	SN	ST	MC	FC	HC
N		23	8	23	23	23	23	23
IHDS motorische Geschwindigkeit (Punkte)	r	-0,567	-0,845	-0,567	-0,672	-0,702	-0,552	-0,328
	p	0,005	0,008	0,005	0,0004	0,0002	0,006	0,126
IHDS psychomotorische Geschwindigkeit (Punkte)	r	-0,064	-0,156	0,063	-0,054	-0,142	-0,180	-0,072
	p	0,771	0,711	0,774	0,808	0,517	0,412	0,743
IHDS Erinnerungsvermögen (Punkte)	r	0,365	0,191	0,346	0,350	0,260	0,276	0,211
	p	0,087	0,651	0,105	0,102	0,231	0,203	0,334
IHDS Gesamtergebnis	r	-0,027	-0,233	0,059	-0,059	-0,153	-0,110	0,037
	p	0,902	0,578	0,789	0,788	0,486	0,617	0,866
MMS zeitliche Orientierung (Punkte)	r	-0,412	-0,577	-0,280	-0,264	-0,280	-0,264	-0,297
	p	0,051	0,134	0,195	0,224	0,195	0,224	0,169
MMS örtliche Orientierung (Punkte)	r	-0,292	n.a.	-0,350	-0,311	-0,428	-0,467	-0,409
	p	0,176	/	0,101	0,148	0,042	0,025	0,053
MMS Objekte erkennen (Punkte)	r	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	p	/	/	/	/	/	/	/
MMS Satz wiederholen (Punkte)	r	0,005	0,169	-0,057	-0,133	-0,093	-0,248	0,251
	p	0,982	0,689	0,795	0,546	0,673	0,253	0,248
MMS Anweisungen befolgen (Punkte)	r	-0,366	-0,764	-0,397	-0,415	-0,301	-0,220	-0,333
	p	0,086	0,027	0,060	0,049	0,163	0,314	0,121
MMS lesen und ausführen (Punkte)	r	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	p	/	/	/	/	/	/	/

Ergebnisse

MMS Satz schreiben (Punkte)	r	-0,477	-0,577	-0,477	-0,509	-0,524	-0,604	-0,588
	p	0,021	0,134	0,021	0,013	0,010	0,002	0,003
MMS zeichnen (Punkte)	r	-0,245	-0,327	-0,050	-0,098	-0,096	-0,117	-0,011
	p	0,259	0,429	0,819	0,656	0,662	0,594	0,961
MMS Gesamtergebnis	r	-0,580	-0,577	-0,471	-0,522	-0,545	-0,620	-0,361
	p	0,004	0,134	0,023	0,011	0,007	0,002	0,090
Verbal Fluency Test (Punkte)	r	-0,022	0,390	0,071	0,026	0,070	-0,164	-0,050
	p	0,919	0,339	0,748	0,905	0,752	0,455	0,822
Digit Span Test vorwärts (Punkte)	r	0,094	-0,124	-0,001	-0,032	0,060	0,008	0,101
	p	0,671	0,771	0,998	0,885	0,787	0,970	0,645
Digit Span Test rückwärts (Punkte)	r	0,036	-0,307	-0,029	-0,057	-0,057	-0,113	-0,053
	p	0,870	0,460	0,896	0,796	0,797	0,608	0,810
Digit Span Test Gesamtergebnis	r	0,067	-0,361	-0,061	-0,105	-0,039	-0,123	0,001
	p	0,761	0,379	0,782	0,634	0,859	0,577	0,996
Pegboard Test starke Hand (Zeit)	r	-0,088	0,024	0,119	0,150	0,260	0,152	0,232
	p	0,688	0,955	0,587	0,494	0,231	0,489	0,286
Pegboard Test schwache Hand (Zeit)	r	-0,061	0,381	0,109	0,158	0,132	0,227	0,207
	p	0,783	0,352	0,622	0,471	0,550	0,298	0,344
Trail Making Test A (Zeit)	r*	0,452	0,738	0,571	0,655	0,652	0,641	0,522
	p	0,03	0,037	0,004	0,001	0,001	0,001	0,011
Trail Making Test B (Zeit)	r*	0,295	0,584	0,416	0,509	0,464	0,574	0,316
	p	0,171	0,129	0,048	0,013	0,026	0,004	0,142

Die Ergebnisse der neurokognitiven Tests wurden mit den Ergebnissen der GFAP-Antikörper Signalmessung korreliert. Bis auf den Trail Making Test wurden für alle Variablen Spearman-Korrelationen errechnet. Beim Trail Making Test A und B wurde eine Pearson-Korrelation errechnet, da die Ergebnisse des Tests die Voraussetzungen für diese Berechnung erfüllten (mit * gekennzeichnet). Der Korrelationskoeffizienten ist mit r gekennzeichnet, die zweiseitige Signifikanz mit p (Signifikanzniveau $p < 0,05$). Signifikante negative Korrelationen wurden gelb hinterlegt, signifikante positive Korrelationen grün. Wenn alle Teilnehmenden bei einem Test das gleiche Ergebnis erzielten, konnte die Berechnung nicht durchgeführt werden. Diese Variablen wurden mit *n.a.* (not applicable) gekennzeichnet. Abkürzungen der Gehirnareale wie folgt: DM = dorsaler Motornukleus des N. Vagus, LC = Locus Coeruleus / Subcoeruleus, SN = Substantia Nigra, ST = Striatum, MC = temporaler Mesocortex, FC = first order sensory association areas, HC = higher order sensory association areas. Die Zahl der Messwerte pro Areal wurde mit N markiert.

HAART = engl.: highly active antiretroviral therapy; IHDS = engl.: International HIV Dementia Scale; MMS = Mini Mental State

4.3.1.1 IHDS

Es fällt auf, dass bei der International HIV Dementia Scale (IHDS) nur die Teilergebnisse des Tests der motorischen Geschwindigkeit signifikant mit dem GFAP-Antikörpersignal korrelieren (siehe Tabelle 6). Die Signale aller Areale außer HC zeigen eine signifikante, starke, negative Korrelation mit den Testergebnissen. Je stärker also das Antikörpersignal, desto schlechter haben die Teilnehmenden abgeschnitten. Die Gesamtergebnisse der IHDS zeigten keine signifikanten Korrelationen.

Ergebnisse

4.3.1.2 Mini Mental State Untersuchung

Bei der Mini Mental State Untersuchung zeigt sich ein differenziertes Bild (siehe Tabelle 6). Die Ergebnisse von ‚Objekte erkennen‘ und ‚lesen und ausführen‘ konnten nicht ausgewertet werden, weil alle Teilnehmenden gleich abschnitten. Die GFAP-Antikörpermengen von jeweils zwei Arealen korrelieren hingegen signifikant negativ mit den Teilergebnissen ‚örtliche Orientierung‘ und ‚Anweisungen befolgen‘. Außerdem korrelieren die Areale DM, SN, ST, MC, FC und HC moderat bis stark negativ mit den Ergebnissen von ‚Satz schreiben‘. Das Gesamtergebnis der MMS Untersuchung zeigt einen signifikant negativen und starken Zusammenhang mit der GFAP-Antikörpersignalintensität der Areale DM, ST, MC und FC. Die Anti-GFAP Signale des Areals SN zeigen eine moderate negative Korrelation mit dem Gesamtergebnis des MMS. Für diese Areale gilt: je intensiver das Anti-GFAP Signal, desto niedriger ist die Testpunktzahl und umgekehrt.

Das Gesamtergebnis des MMS und die GFAP-Signale von DM werden in Abbildung 10 als lineare Regression dargestellt. Diese Berechnung indiziert, dass die Signalintensität der GFAP-Antikörper einen Einfluss auf das Gesamtergebnis des MMS hat ($p = 0,006$). Etwa 31 % der Streuung der MMS Ergebnisse kann durch die Anti-GFAP Signalintensität von DM erklärt werden ($r^2 = 0,308$).

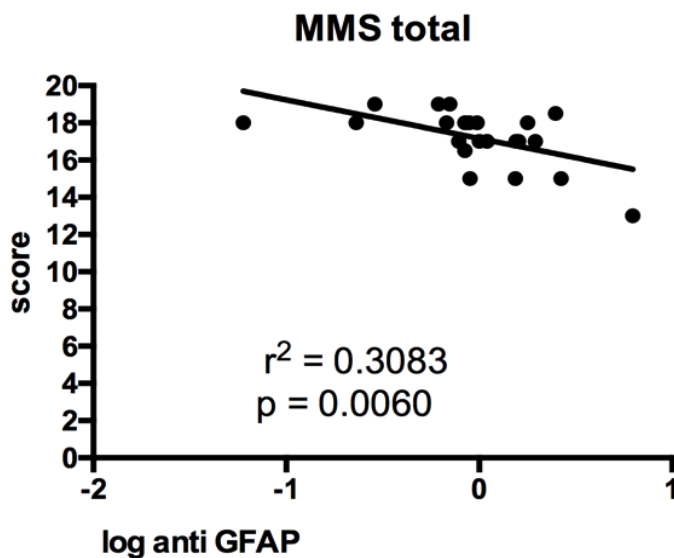


Abbildung 10 Lineare Regression des MMS und der Anti-GFAP Signale des DM-Areals (HIV/HAART)

Ergebnisse

Um den Zusammenhang zwischen der Anti-GFAP Signalintensität des DM-Areals der HIV/HAART-Gruppe und den MMS Gesamtergebnissen zu untersuchen wurde eine lineare Regression errechnet. Die Signifikanz wurde als p angegeben, das Quadrat des Pearson-Korrelationskoeffizienten r stellt das Bestimmtheitsmaß dar. Die Signalintensität der GFAP-Antikörper hat einen Einfluss auf das Gesamtergebnis des MMS ($p = 0,006$). Etwa 30 % der Streuung der MMS Ergebnisse kann durch die GFAP-Signale erklärt werden.
DM = dorsaler Motornukleus des N. Vagus; HAART = engl.: highly active antiretroviral therapy; MMS = engl.: Mini Mental State

Die Ergebnisse des MMS werden zudem wahrscheinlich durch das Bildungsniveau der Teilnehmenden beeinflusst. Um zu überprüfen, ob die Korrelationen der Testergebnisse mit den Anti-GFAP Signalen auch ohne den Einfluss der Bildung noch signifikant sind, wurden Partialkorrelationen berechnet (exemplarische Berechnung für das DM-Areal siehe Tabelle 7). Diese Berechnungen basieren auf Korrelationen nach Pearson. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson (siehe Tabelle 7, $r = -0,550$) unterscheidet sich nur geringfügig vom Korrelationskoeffizienten nach Spearman (siehe Tabelle 6, $r = -0,580$). Die Ergebnisse des MMS korrelieren signifikant positiv mit den Bildungsjahren der Teilnehmenden ($r = 0,564$, $p = 0,005$). Wenn man für die Bildungsjahre kontrolliert, sinkt der Korrelationskoeffizient von $r = -0,580$ auf $r = -0,433$, die Korrelation ist allerdings immer noch signifikant und von moderater Stärke. Diese Beobachtung gilt ebenso für die Areale SN, ST; MC und FC (siehe Tabelle 8). Folglich korrelieren die MMS Ergebnisse und die der Antikörpermessung signifikant negativ miteinander, auch unter Berücksichtigung der Bildungsjahre.

Tabelle 7 Partialkorrelationen von MMS, Bildungsjahren und Anti-GFAP Signalstärken des DM-Areals (HIV/HAART)

Kontrollvariablen			MMS Gesamtergebnis	DM HIV/ HAART	Bildungsjahre
keine	MMS	r	1,000	-0,550	0,564
	Gesamtergebnis	p		0,007	0,005
	DM HIV/ HAART	r	-0,550	1,000	-0,392
		p	0,007		0,064
	Bildungsjahre	r	0,564	-0,392	1,000
		p	0,005	0,064	
Bildungsjahre	MMS	r	1,000	-0,433	
	Gesamtergebnis	p		0,044	
	DM HIV/ HAART	r	-0,433	1,000	
		p	0,044		

Um zu evaluieren, ob die Ergebnisse der Korrelationen auch ohne den Einfluss des Bildungsstandes noch signifikant sind, wurden Partialkorrelationen berechnet.

Ergebnisse

Diese Berechnung wird hier exemplarisch für die Signale des DM-Areals der HIV/HAART-Gruppe dargestellt. r steht für den Pearson-Korrelationskoeffizienten, p für die zweiseitige Signifikanz. Signifikante negative Korrelationen wurden gelb hinterlegt, signifikante positive Korrelationen wurden grün markiert. Die Korrelation des MMS mit den DM-Signalen ist auch nach Kontrolle für die Bildungsjahre noch signifikant ($r = -0,433$).
DM = dorsaler Motornukleus des N. Vagus; HAART = engl.: highly active antiretroviral therapy; MMS = engl.: Mini Mental State

Tabelle 8 Partialkorrelationen von MMS, Bildungsjahren und Anti-GFAP Signalstärken

Kontrollvariablen	MMS Gesamtergebnis			
	keine		Bildungsjahre	
	r	p	r	p
Anti-GFAP DM (HIV/HAART)	-0,55	0,007	-0,433	0,044
Anti-GFAP LC (HIV/HAART)	-0,696	0,055	-0,552	0,199
Anti-GFAP SN (HIV/HAART)	-0,566	0,005	-0,457	0,032
Anti-GFAP ST (HIV/HAART)	-0,640	0,001	-0,545	0,009
Anti-GFAP MC (HIV/HAART)	-0,638	0,001	-0,618	0,002
Anti-GFAP FC (HIV/HAART)	-0,703	0,0002	-0,645	0,001
Anti-GFAP HC (HIV/HAART)	-0,405	0,055	-0,298	0,178

Um zu evaluieren, ob die Ergebnisse der Korrelationen auch ohne den Einfluss des Bildungsstandes noch signifikant sind, wurden Partialkorrelationen berechnet. r steht für den Pearson-Korrelationskoeffizienten, p für die zweiseitige Signifikanz. Signifikante negative Korrelationen wurden gelb hinterlegt, signifikante positive Korrelationen wurden grün markiert. Die Korrelation des MMS mit den DM-, SN-, ST-, MC- und FC-Signalen ist auch nach Kontrolle für die Bildungsjahre noch signifikant. Die adjustierten Korrelationen des MMS mit den Arealen DM und SN sind von moderater Stärke, die des MMS mit den Arealen ST, MC und FC sind stark. Abkürzungen der Gehirnareale wie folgt: DM = dorsaler Motornukleus des N. Vagus, LC = Locus Coeruleus / Subcoeruleus, SN = Substantia Nigra, ST = Striatum, MC = temporaler Mesocortex, FC = first order sensory association areas, HC = higher order sensory association areas.

HAART = engl.: highly active antiretroviral therapy; MMS = engl.: Mini Mental State

4.3.1.3 Trail Making Test

Beim Trail Making Test (TMT) stoppte man die Zeit, die die Teilnehmenden für die Erledigung einer bestimmten Aufgabe benötigten. Folglich korreliert die Anti-GFAP Signalintensität hier positiv mit den Testergebnissen (siehe Tabelle 6). Die Signale aller Areale korrelieren signifikant positiv mit den TMT A Ergebnissen. Das Signal des DM-Areals korreliert moderat mit den TMT A Ergebnissen, die

Ergebnisse

der anderen Areale zeigen eine starke Korrelation. Hat eine Testperson ein starkes Anti-GFAP Signal, braucht diese Person länger für den TMT A. Umgekehrt gilt auch, dass eine Person mit einem schlechten TMT A Ergebnis ein höheres GFAP-Antikörper Signal hat. Die TMT B Ergebnisse korrelieren signifikant positiv mit den Ergebnissen der GFAP-Antikörper Signalmessung der Areale SN, ST, MC und FC. Diese Korrelationen sind ebenfalls moderat bis stark. Die Ergebnisse des TMT und die der Anti-GFAP Signale von DM werden in Abbildung 11 als lineare Regression dargestellt. Hier wird deutlich, dass die GFAP-Antikörper Signalintensität des DM-Areals einen Einfluss auf das Ergebnis des TMT A hat (siehe Abbildung 11A, $p = 0,03$). Etwa 20 % der Streuung der TMT A Ergebnisse kann durch die Anti-GFAP Signalintensität von DM erklärt werden ($r^2 = 0,20$). Der TMT B und die Anti-GFAP Signale von DM korrelieren nicht signifikant miteinander (siehe Abbildung 11B und Tabelle 6).

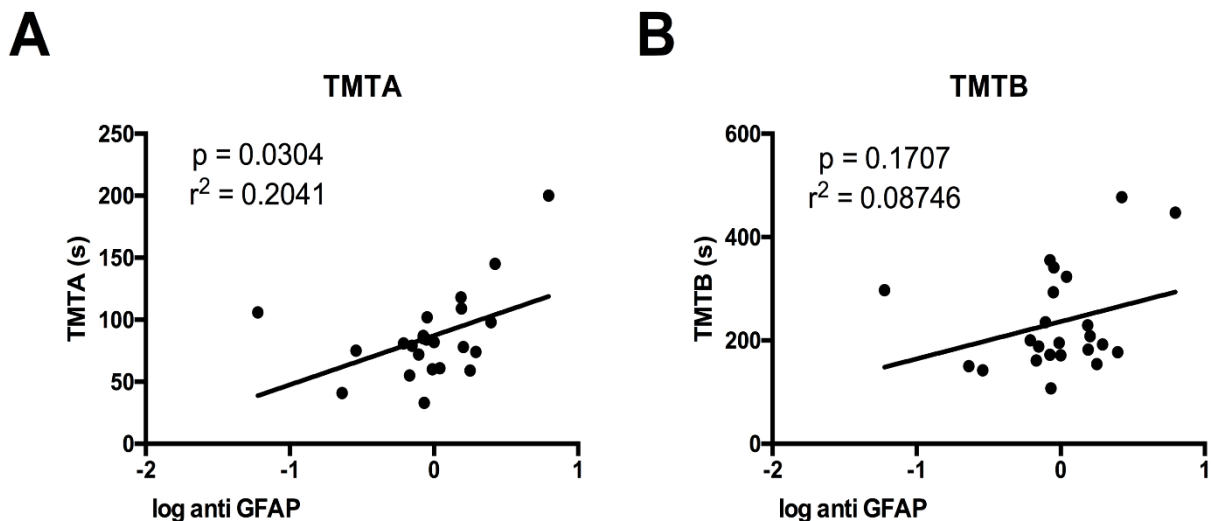


Abbildung 11 Lineare Regression des TMT und der Anti-GFAP Signale des DM-Areals (HIV/HAART)

Um den Zusammenhang zwischen der GFAP-Signalintensität des DM-Areals und den Ergebnissen des TMT A und B zu untersuchen wurden lineare Regressionen errechnet. Die Signifikanz wurde als p angegeben, das Quadrat des Pearson-Korrelationskoeffizienten r stellt das Bestimmtheitsmaß dar. Auf der x-Achse sind die Ergebnisse des TMT in Sekunden eingezeichnet. Die Signalintensität der GFAP-Antikörper des DM-Areals hat einen Einfluss auf das Ergebnis des TMT A ($p = 0,03$), aber nicht auf den TMT B ($p = 0,17$). Etwa 20 % der Streuung der TMT A Ergebnisse kann durch die GFAP-Signale erklärt werden ($r^2 = 0,20$). DM = dorsaler Motornukleus des N. Vagus; TMT = engl trail making test

Ergebnisse

4.3.1.4 Verbal Fluency Task, Digit Span Test und Pegboard Test

Die Korrelationen der Ergebnisse der Verbal Fluency Task, des Pegboard Tests und des Digit Span Tests mit den Anti-GFAP Signalen waren nicht signifikant (siehe Tabelle 6).

4.3.2 Studiengruppe 2 (Kontrollen)

Tabelle 9 zeigt die Ergebnisse der Korrelationen für die Kontrollgruppe. Von allen Korrelationen sind nur fünf signifikant. Das LC-Signal und der Verbal Fluency Test korrelieren negativ miteinander. Die Zeiten des Pegboard Tests mit der starken Hand korrelieren negativ mit den Anti-GFAP Signalen der Areale ST, MC und FC. Das Pegboard Testergebnis mit der schwachen Hand korreliert positiv mit dem LC-Signal.

Tabelle 9 Korrelationen Kontrollgruppe

Kontrollen		DM	LC	SN	ST	MC	FC	HC
N		12	8	12	12	12	12	12
IHDS motorische Geschwindigkeit (Punkte)	r	-0,050	-0,252	-0,181	-0,234	-0,340	-0,555	-0,462
	p	0,876	0,547	0,574	0,465	0,279	0,061	0,130
IHDS psychomotorische Geschwindigkeit (Punkte)	r	0,044	n.a.	-0,131	0,000	-0,044	0,044	0,044
	p	0,893	/	0,685	1,000	0,893	0,893	0,893
IHDS Erinnerungsvermögen (Punkte)	r	-0,044	n.a.	0,044	0,219	0,306	0,480	0,480
	p	0,893	/	0,893	0,495	0,334	0,114	0,114
IHDS Gesamtergebnis	r	-0,069	-0,252	-0,198	-0,152	-0,235	-0,373	-0,272
	p	0,831	0,547	0,537	0,637	0,463	0,233	0,393
MMS zeitliche Orientierung (Punkte)	r	0,218	n.a.	-0,044	-0,219	-0,131	0,131	0,306
	p	0,495	/	0,893	0,495	0,685	0,685	0,334
MMS örtliche Orientierung (Punkte)	r	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	p	/	/	/	/	/	/	/
MMS Objekte erkennen (Punkte)	r	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	p	/	/	/	/	/	/	/
MMS Satz wiederholen (Punkte)	r	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	p	/	/	/	/	/	/	/
MMS Anweisungen befolgen (Punkte)	r	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	p	/	/	/	/	/	/	/
MMS lesen und ausführen (Punkte)	r	0,218	n.a.	-0,044	-0,219	-0,131	0,131	0,306
	p	0,495	/	0,893	0,495	0,685	0,685	0,334
MMS Satz schreiben (Punkte)	r	0,216	0,082	0,143	0,055	0,101	0,133	0,373
	p	0,499	0,846	0,658	0,864	0,754	0,679	0,233
MMS zeichnen (Punkte)	r	-0,079	-0,316	0,000	-0,079	-0,138	-0,138	0,256
	p	0,808	0,446	1,000	0,807	0,669	0,669	0,421

Ergebnisse

MMS Gesamtergebnis	r	-0,004	-0,316	-0,020	-0,147	-0,172	-0,086	0,317
	p	0,990	0,446	0,952	0,648	0,592	0,790	0,315
Verbal Fluency Test (Punkte)	r	-0,452	-0,731	-0,459	-0,457	-0,509	-0,251	-0,039
	p	0,140	0,040	0,133	0,136	0,091	0,432	0,905
Digit Span Test vorwärts (Punkte)	r	-0,169	-0,064	-0,040	-0,014	0,223	0,184	0,248
	p	0,599	0,881	0,903	0,965	0,486	0,568	0,436
Digit Span Test rückwärts (Punkte)	r	-0,028	-0,289	-0,128	0,032	0,142	0,245	0,092
	p	0,930	0,487	0,693	0,921	0,660	0,443	0,776
Digit Span Test Gesamtergebnis	r	-0,163	-0,313	-0,166	-0,074	0,163	0,209	0,138
	p	0,613	0,450	0,605	0,818	0,613	0,515	0,669
Pegboard Test starke Hand (Zeit)	r	-0,315	-0,643	-0,557	-0,775	-0,806	-0,680	-0,476
	p	0,318	0,086	0,060	0,003	0,002	0,015	0,117
Pegboard Test schwache Hand (Zeit)	r	0,547	0,886	0,488	0,353	0,175	0,018	-0,277
	p	0,065	0,003	0,108	0,260	0,585	0,957	0,383
Trail Making Test A (Zeit)	r^*	0,291	0,355	0,185	0,195	0,108	0,112	0,003
	p	0,359	0,388	0,565	0,545	0,738	0,729	0,991
Trail Making Test B (Zeit)	r^*	0,334	0,359	0,201	0,117	0,197	0,217	0,162
	p	0,289	0,383	0,531	0,717	0,540	0,498	0,615

Die Ergebnisse der neurokognitiven Tests wurden mit den Ergebnissen der GFAP-Antikörper Signalmessung korreliert. Bis auf den TMT wurden für alle Variablen Spearman-Korrelationen errechnet. Beim TMT A und B wurde eine Pearson-Korrelation errechnet, da die Ergebnisse des Tests die Voraussetzungen für diese Berechnung erfüllten (mit * gekennzeichnet). Der Korrelationskoeffizienten ist mit r gekennzeichnet, die zweiseitige Signifikanz mit p (Signifikanzniveau $p < 0,05$). Signifikante negative Korrelationen wurden gelb hinterlegt, signifikante positive Korrelationen grün. Wenn alle Teilnehmenden bei einem Test das gleiche Ergebnis erzielten, konnte die Berechnung nicht durchgeführt werden. Diese Variablen wurden mit *n.a.* (not applicable) gekennzeichnet. Abkürzungen der Gehirnareale wie folgt: DM = dorsaler Motornukleus des N. Vagus, LC = Locus Coeruleus / Subcoeruleus, SN = Substantia Nigra, ST = Striatum, MC = temporaler Mesocortex, FC = first order sensory association areas, HC = higher order sensory association areas. Die Zahl der Messwerte pro Areal wurde mit N markiert. HAART = engl.: highly active antiretroviral therapy; IHDS = engl.: International HIV Dementia Scale; MMS = Mini Mental State

4.4 Korrelation der Anti-GFAP Signale mit den CD4+-Zellzahlen der HIV-positiven Teilnehmenden

Die Zahl der CD4+ T-Lymphozyten wurde bei den HIV-Patienten und -Patientinnen im Rahmen des Studieneinschlusses bestimmt, außerdem lag die niedrigste CD4+-Zellzahl vor. Es konnten keine signifikanten Korrelationen zwischen den CD4+-Zellzahlen und den Anti-GFAP Signalintensitäten festgestellt werden.

Ergebnisse

Tabelle 10 Korrelationen der Anti-GFAP Signale mit den CD4+-Zellzahlen

Gehirnareal		DM	LC	SN	ST	MC	FC	HC
Niedrigste CD4+-Zellzahl	r	-0,244	-0,349	-0,198	-0,153	-0,045	-0,009	0,011
	p	0,274	0,444	0,378	0,496	0,842	0,968	0,962
Aktuelle CD4+-Zellzahl	r	-0,280	-0,720	-0,286	-0,238	-0,087	-0,002	-0,326
	p	0,207	0,068	0,197	0,285	0,701	0,993	0,139

Der Pearson-Korrelationskoeffizienten ist mit *r* gekennzeichnet, die zweiseitige Signifikanz mit *p*. Für einen Studienteilnehmenden wurden keine CD4+-Zahlen eingetragen, d.h. für LC betrug N=7 und für alle anderen Areale galt N=22. Die Korrelationen der Anti-GFAP Signalintensität mit den CD4+-Zellzahlen ergab keine signifikanten Ergebnisse. Abkürzungen der Gehirnareale wie folgt DM = dorsaler Motornukleus des N. Vagus, LC = Locus Coeruleus / Subcoeruleus, SN = Substantia Nigra, ST = Striatum, MC = temporaler Mesocortex, FC = first order sensory association areas, HC = higher order sensory association areas.

5. Diskussion

5.1 GFAP Signalintensitäten der Studiengruppen

In dieser Arbeit konnte kein signifikanter Unterschied im Vorkommen von GFAP-Autoantikörpern zwischen HIV-Patienten und -Patientinnen und Mitgliedern der Kontrollgruppe festgestellt werden. Bis zur Fertigstellung dieser Arbeit konnten keine anderen Studien, die die Menge an GFAP-Autoantikörpern bei Menschen mit HIV messen, gefunden werden. Es gibt jedoch Untersuchungen zum GFAP-Level bei PLWH. Zum Beispiel konnten Sporer et al. in ihrer klinischen Studie aus dem Jahr 2004 keinen signifikanten Unterschied im GFAP-Liquorlevel zwischen HIV-positiven und HIV-negativen Menschen entdecken (108). Allerdings fanden sie bei neun der 45 HIV-positiven Teilnehmenden ein erhöhtes GFAP-Level, den höchsten Wert hatte ein Patient mit HIV-assoziiertes Demenz im letzten Stadium (108). Sporer und sein Team inkludierten jedoch ausschließlich Testpersonen mit neurologischen Symptomen oder Erkrankungen (108). Die Mitglieder der Kontrollgruppe litten an nicht-entzündlichen neurologischen Erkrankungen (108). Doch auch solche Erkrankungen können, wie ebenfalls von Sporer erwähnt, zu einer GFAP-Erhöpfung führen (108). Eine Studie des Universitätskrankenhauses Göteborg aus dem Jahr 2008 maß ebenfalls das GFAP-Level im Liquor ihrer HIV-Patienten und -Patientinnen (109). Auch hier konnten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (109). Zwei der 22 HIV-positiven Teilnehmenden dieser Studie hatten AIDS und nur bei diesen beiden konnte ein leicht erhöhtes GFAP-Liquorlevel gemessen werden (109). Diese Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass sich ein erhöhtes GFAP-Level in Liquor oder Blut erst in einem sehr fortgeschrittenen Stadium der HIV-Infektion signifikant vom GFAP-Level bei Kontrollen unterscheidet. Diese Vermutung konnte in der hier vorliegenden Doktorarbeit nicht überprüft werden, da hier GFAP-Autoantikörper und nicht GFAP untersucht wurde. Zur Klärung dieser Frage besteht demnach weiterer Forschungsbedarf.

Fraglich ist auch, inwiefern die Krankengeschichte von Mitgliedern der Kontrollgruppe eine Rolle spielt. Konnte kein signifikanter Unterschied in der

Diskussion

Antikörper-Signalintensität festgestellt werden, weil die Kontrollen in Folge von neurologischen Vorerkrankungen bereits GFAP-Autoantikörper gebildet hatten? In der Studie der Forscherinnen Zhang und Zoltewicz wurde diese Problematik ebenfalls diskutiert (100). Sie untersuchten, ob es bei Menschen mit schweren Gehirnerschütterungen zur Bildung von GFAP-Autoantikörper kommt (100). Sie konnten spezifische, gegen GFAP und seine Zerfallsprodukte (GFAP BDP) gerichtete Autoantikörper nicht nur bei 64,2 % der Teilnehmenden mit Gehirnerschütterungen nachweisen, sondern auch bei 15,6 % der gesunden Kontrollpersonen (100). Sie vermuten, dass diese GFAP-Antikörper entweder natürliche Antikörper sind, die mit GFAP und GFAP BDP kreuzreagieren oder durch frühere Verletzungen des Gehirns zustande gekommen sind (100). Bei der HAND-1 Studie wurden keine weiterführenden Daten über die Krankheitsgeschichte von Mitgliedern der Kontrollgruppe erhoben, demnach konnte die Ätiologie der Antikörper bei diesen Menschen nicht ergründet werden.

5.2 GFAP Signalintensitäten der Gehirnareale

Die Messung der GFAP-Antikörper Signalintensität fand an Homogenaten aus sieben verschiedenen Gehirnarealen statt. Der dorsale Motornukleus des Nervus Vagus (DM), der Locus Coeruleus (LC) und die Substantia Nigra (SN) sind dem Hirnstamm zuzurechnen. Das Striatum (ST) befindet sich im Großhirn, der temporale Mesokortex (MC) und die *first order* (FC) und *higher order* (HC) *sensory association areas* sind Teil der Großhirnrinde (siehe Tabelle 1, S. 23).

Die GFAP-Antikörper Signalintensitäten unterscheiden sich in diesen Gehirnarealen signifikant voneinander. Die Areale des Hirnstamms zeigen tendenziell ein stärkeres Anti-GFAP-Signal als die Areale des Kortex (siehe Abbildung 8, S.44). Dieses Verteilungsmuster wurde auch in der Studie der Autorin Martin und des Autors O'Callaghan beobachtet (110). Sie untersuchten die Konzentration von GFAP in Mäuse- und Rattengehirnen (110). Die höchsten Konzentrationen fanden sie im Bulbus Olfactorius, Hypothalamus und Cerebellum, die niedrigsten in Kortex und Striatum (110). Auch die Forschungsgruppe um Hajós und Kálmán führte im Jahr 1989 GFAP-Immunfärbungen von Rattengehirnen durch und machte ähnliche

Beobachtungen (111, 112). Eine besonders deutliche Immunfärbung zeigte sich in der Medulla Oblongata, der Substantia Nigra, dem Hippocampus, dem Hypothalamus, dem limbischen Kortex und den inneren und äußeren Randgebieten des Neokortex (111, 112). Eine lediglich geringe GFAP-Expression fanden Hajós und Kálmán in den übrigen Regionen des Hirnstammes und im Striatum (111, 112). Eine neuere Studie an Rattengehirnen aus dem Jahr 2005 bestätigte zudem die Beobachtung, dass die meisten Regionen im Hirnstamm im Vergleich zu Kortex und Kleinhirn tendenziell weniger GFAP-positive Astrozyten beherbergen (113).

Des Weiteren stellten die Forschenden in dieser Studie fest, dass sich das GFAP-Verteilungsmuster in Gehirnen von ausgewachsenen und neugeborenen Ratten stark ähnelt (113). Dieses Erkenntnis legt nahe, dass die Verteilung von GFAP-positiven Astrozyten bereits in der fetalen Entwicklung festgelegt wird (113). Allerdings verändert sich die GFAP-Expression und damit die Morphologie von Astrozyten im Alter (114). Wie Rodríguez und sein Team zeigen konnten, wird bei alten Mäusen im Vergleich zu jungen Mäusen im Hippocampus vermehrt GFAP exprimiert, im entorhinalen Kortex dagegen weniger (114).

Die bisher erwähnten Studien wurden an Nagetiergehirnen durchgeführt. Wie in der Übersichtsarbeit von Matias erwähnt, muss die Übertragbarkeit solcher Ergebnisse auf den Menschen noch eingehender erforscht werden (115), denn die Eigenschaften und Subpopulationen der menschlichen Astrozyten sind einzigartig (116).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass GFAP-positive Astrozyten im Gehirn sehr uneinheitlich exprimiert werden und dass die Verteilung unter anderem vom Gesundheitszustand und Alter des Menschen abhängt (115).

5.3 Die Rolle von GFAP und GFAP-Autoantikörpern in der Pathogenese von HAND

Die Hypothese zur Rolle von GFAP und GFAP-Antikörpern bei der Entstehung von HAND kann folgendermaßen zusammengefasst werden: das ZNS wird bereits in der Frühphase der HIV-Erkrankung infiziert (58) und die infizierten Zellen produzieren das virale Protein Tat, das wiederum eine erhöhte GFAP-

Diskussion

Expression induziert (90). Die GFAP-Aggregation löst in den infizierten Astrozyten zelluläre Stressreaktionen aus, die im schlimmsten Fall im Zelltod enden (90). GFAP und seine Zerfallsprodukte gelangen daraufhin über das Ventrikelsystem und die Blut-Hirn-Schranke in den allgemeinen Blutkreislauf (117). Die dort patrouillierenden Zellen des Immunsystems reagieren auf das Autoantigen indem sie Autoantikörper produzieren (117). Diese GFAP-Autoantikörper zirkulieren dann im Blut der Betroffenen und könnten potentiell zytotoxisch und pathogen wirken (100). Die Ergebnisse der hier vorliegenden Promotion sprechen jedoch gegen einen inhärenten pathologischen oder zytotoxischen Effekt der GFAP-Autoantikörper im Blut, da kein signifikanter Unterschied im Vorkommen von GFAP-Autoantikörpern bei PLWH und Mitgliedern der Kontrollgruppe gefunden wurde. Auch in anderen Studien wurden bereits GFAP-Autoantikörper im Blut von gesunden Teilnehmenden nachgewiesen (118-120). Wie bereits unter 1.2.1 erläutert, kann es im Verlauf einer HIV-Infektion jedoch zu einer vermehrten GFAP-Aggregation und einer erhöhten Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke kommen. Dadurch könnten GFAP-Autoantikörper in das Gehirn gelangen und zu Immunpathologien führen. Solche GFAP-Autoimmunopathien können mit Symptomen wie Krämpfen, kognitiven Beeinträchtigungen oder motorischen Störungen einhergehen (91). Dies könnte der Grund sein, warum die GFAP-Antikörpersignale mit Teilergebnissen der International HIV Dementia Scale (IHDS) korrelieren.

5.3.1 Entstehung und Folgen der GFAP-Aggregation

Tat ist ein Regulatorprotein, das vom HI-Virus produziert wird um die Transkription zu stimulieren (11). Es scheint außerdem eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von HAND zu spielen (90). Das Team um Yan Fan und Johnny Ye publizierte im Jahr 2016 eine Studie, in der sie nachweisen konnten, dass Tat mittels GFAP zu neurotoxischen Effekten führen kann (90). Um die molekularen Mechanismen der Tat-Toxizität aufzudecken, nutzten sie genveränderte Mäuse (90). Sie stellten fest, dass die Anwesenheit von Tat in den Astrozyten der Mäusegehirne die GFAP-Expression hochreguliert (90). Diese zunehmende Expression induzierte eine Akkumulation von GFAP im Zytoplasma

Diskussion

der Astrozyten und veränderte das Netzwerk der Intermediärfilamente (90). Außerdem beobachteten sie, dass die Neurone deutlich weniger dendritische Fortsätze aufwiesen (90). Die Gruppe um die Forscherin Monica Bucciantini schreibt in einem in der Zeitschrift *Nature* veröffentlichten Artikel, dass Proteinaggregate eine inhärente Zytotoxizität aufweisen, die zum Zelltod führen könnte (121). Zudem gibt es starke Hinweise, dass eine Vielzahl von neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer oder Parkinson durch die Fehlfaltung, Aggregation oder Akkumulation von Proteinen im Gehirn verursacht wird (122). Auch speziell für GFAP-Aggregate existieren solche Hinweise, insbesondere aus der Forschung zur Alexander-Krankheit. Diese genetische Erkrankung wird durch Mutationen in GFAP-codierenden Genen ausgelöst (86). Erhöhte Level von normalem und mutiertem GFAP führen hier unter anderem zu Makrozephalie, Krampfanfällen und Einschränkungen der Kognition (84, 123). GFAP-Aggregate fördern demnach die Entstehung von neurotoxischen Effekten und Astrozytose (17).

5.3.2 GFAP und zelluläre Stressreaktionen

Darüber hinaus berichten Fan und Ye, dass die durch Tat induzierten GFAP-Aggregate zu einer zellulären Stressreaktion, der *unfolded protein response* (UPR) führten (90). Die Forscherin Parvaneh Mehrbod und ihr Team haben im Jahr 2019 einen Übersichtsartikel zu zellulären Stressreaktionen im Zusammenhang mit Arbo-, Influenza- und HI-Viren veröffentlicht (124). Reaktionen einer Zelle auf Stressoren jeglicher Art können entweder protektiv sein (UPR) oder zum Zelltod durch Autophagie, Apoptose oder Nekrose führen, falls der Schaden nicht mehr behoben werden kann (124). Für die korrekte Faltung und Reifung von Proteinen in der Zelle ist das endoplasmatische Retikulum (ER) zuständig (124). Etwa ein Drittel aller Proteine werden im ER synthetisiert (124). Als Reaktion auf eine Reihe von Störeinflüssen bei der Proteinproduktion laufen Regulationsmechanismen ab (124). Die Steuerung dieser Mechanismen erfolgt über einen intrazellulären Signalweg, der „*unfolded protein response*“ genannt wird (125). Die UPR umfasst drei Reaktionen (125). Zuerst wird die Proteinsynthese vorübergehend heruntergefahren, um die Vorlast

zu senken (125). Dann wird die Kapazität des ER im Umgang mit un- oder fehlgefalteten Protein erhöht, indem vermehrt UPR Zielgene transkribiert werden (125). Sollte auch das nicht zielführend sein, wird der Zelltod eingeleitet (125). Auch andere Bestandteile des HI-Virus können eine zelluläre Stressreaktion auslösen (124). Das Oberflächenprotein env aktiviert die Apoptose und die UPR und inhibiert die Autophagie (124). Das Vpr Gen kodiert für ein Protein, dass durch Zellzyklusarrest die Apoptose herbeiführen kann (124). Das Nef Protein und die HIV Proteasen sind ebenfalls in der Lage apoptotische Prozesse zu stimulieren (124). Werden die GFAP-Aggregate als auslösender Stressor nicht beseitigt, mündet diese Kettenreaktion im Zelltod (125).

5.3.3 Entstehung der GFAP-Autoantikörper

Das Team um die Forschenden Yang und Wang beschreibt in einem Übersichtsartikel aus dem Jahr 2015 wie die GFAP-Autoantikörper entstehen könnten (117). Zunächst werden GFAP und vor allem die Zerfallsprodukte (GFAP BDP) in die interstitielle Flüssigkeit abgegeben (117). Von dort diffundieren sie in den subarachnoidalen Liquorraum und folgen dem natürlichen Liquorfluss, bis sie schließlich die Blut-Hirn-Schranke passieren und in den allgemeinen Blutkreislauf übergehen (117). Das Immunsystem stuft GFAP und GFAP-BDP als körperfremd ein und beginnt Antikörper zu produzieren (117). Folglich können GFAP und GFAP-BDP in vulnerablen Personengruppen die Selbsttoleranz des Immunsystems stören und als Autoantigen fungieren (100, 117). Dies wird bei PLWH insbesondere auf die gestörte T-Zellfunktion und die durch B-Lymphozyten vermittelte Autoimmunität zurückgeführt (126, 127). Durch die erhöhte Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke könnten die im Blut zirkulierenden GFAP-Autoantikörper in das Gehirn gelangen und zu Immunpathologien führen.

Die Wissenschaftlerinnen Zhang und Zoltewicz beobachteten zudem eine intensive Färbung von 38 kDa GFAP in sterbenden und toten Astrozyten (100). Sie mutmaßen, dass GFAP in vivo auch in degenerierten Astrozyten stabil bleibt und daher ein bevorzugtes Ziel des Immunsystems darstellt (100). Hinzu kommt, dass insbesondere im Rahmen von zellulären Stressreaktionen Proteine von

Diskussion

einem Enzym citrulliniert werden können (128). Bei diesem Vorgang wird die Aminosäure Arginin zur Aminosäure Citrullin umgewandelt (128). Auch bei GFAP ist dieser Vorgang bekannt (129). Im Rahmen der Autophagie werden citrullinierte Proteine auf MHC II Zellen präsentiert, womöglich können die Zellen das Immunsystem auf diese Art auf eine Stresssituation aufmerksam machen (128). Das Team um Yang und Wang stellte folglich die Frage in den Raum, ob GFAP auf Grund der Citrullinierung von Peptidverbindungen vom Immunsystem bevorzugt als Autoantigen erkannt wird (117). Ein Beispiel für einen solchen Vorgang ist die Rheumatoide Arthritis, bei der citrullinierte Peptide als Autoantigen fungieren und die Produktion von Autoantikörpern induzieren (130). Weitere posttranslationale Modifikationen von GFAP können, wie bei Gschmack erwähnt, die Struktur des Proteins derartig verändern, dass es vom Immunsystem nur uneinheitlich erkannt wird (99). Sullivan und ihr Team fanden zudem bei Untersuchungen an Gehirnen von Schweinen heraus, dass phosphoryliertes GFAP mit schlechteren neurologischen Outcomes und histologischen Nervenschäden assoziiert ist (131).

5.3.4 Folgen der GFAP-Autoantikörper

IgG Antikörper wie die anti-GFAP Moleküle (132) können die intakte Bluthirnschranke in kleinen Mengen überwinden (133) (134). Zhang und Zoltewicz legten Gliazellkulturen an um die Auswirkungen der Antikörper auf die Zellen zu studieren (100). Sie inkubierten die Zellkulturen unter anderem mit Serum von Menschen mit SHT, die GFAP-Autoantikörpern gebildet hatten (100). In der Immunfärbung zeigte sich, dass anti-GFAP vor allem in den Zellkörpern und kurzen Fortsätzen von Astrozyten zu finden war (100). Die Autorinnen vermuten, dass die GFAP-Antikörper die Funktionen des sauren Gliafaserproteins, wie zum Beispiel die Expansion des Zytoskeletts, stören (100). Überdies waren sterbende oder tote Astrozyten besonders stark gefärbt (100). Beim Zelltod ziehen sich die Astrozyten zusammen, bis sie rundlich erscheinen (100). Die starke Immunfärbung lag demnach wahrscheinlich an der erhöhten Konzentration von GFAP in dem deutlich verkleinerten Zellvolumen (100). Hinzu kommt die wichtige Beobachtung, dass anti-GFAP Gliazellen schwer

Diskussion

beschädigen kann, kennzeichnend hierfür ist eine erhöhte LDH-Freisetzung der Zellen (100). Insgesamt stellten sie also fest, dass GFAP-Autoantikörper das Potenzial haben pathogene und zytotoxische Effekte in den Zellen zu induzieren (100). Ein weiterer Hinweis auf die möglicherweise bestehende Pathogenität von GFAP-Autoantikörpern ist ihr Vorkommen bei einigen neurologischen Erkrankungen wie Multipler Sklerose (120), Alzheimer (118) und Vaskulärer Demenz (118). Zudem gibt es eine Form der Autoimmun-Meningoenzephalitis, die durch eine GFAP-Autoimmunopathie ausgelöst wird (93, 135). GFAP-IgG-Autoantikörper führen hier zu einer Astrozytopathie und können mit Symptomen wie Krämpfen, kognitiven Beeinträchtigungen und motorischen Störungen einhergehen (91). GFAP-Autoimmunopathien können sporadisch oder paraneoplastisch auftreten und sprechen oft auf eine Immuntherapie an (91).

Es finden sich in der Literatur auch Hinweise auf einen potentielle positiven Nutzen von IgG-Antikörpern. Das Team um die Forschenden Nagele und Han publizierte 2013 in einem Artikel die These, dass IgG Autoantikörper im Serum von allen Menschen in größeren Mengen vorkommen (136). Sie fanden heraus, dass die Varianz der Antikörper stark vom Individuum und von Faktoren wie Alter, Geschlecht und Vorerkrankungen abhängt (136). Sie stellten demzufolge die Hypothese auf, dass die IgG-Autoantikörper eine wichtige Funktion erfüllen (136). Nach Nagele und Han sichern die IgG-Autoantikörper die Entsorgung von spezifischen Neben- und Abfallprodukten, die bei bestimmten Erkrankungen oder nach Traumata entstehen können (136). Zur Entsorgung müsste die Autoantikörperproduktion gesteigert werden, folglich könnten die Immunglobuline zu diagnostischen Zwecken genutzt werden (136). In einem im Jahr 2006 in der Zeitschrift *Science* erschienen Artikel der Forscher Kaneko, Nimmerjahn und Ravetch werden die pro- und anti-inflammatorischen Eigenschaften von Immunglobulin G beschrieben (137). Sie gehen davon aus, dass die antientzündliche Wirkung des Fc-Fragments durch das Anhängen von Derivaten der Neuraminsäure („Sialisierung“) an Polysaccharidketten im Kern des Fragments bestimmt wird (137). Sie vergleichen die Sialisierung des Fc-Fragments mit einen „Schalter“ (137). Bei Kontakt mit einem Antigen wird die Sialisierung heruntergefahren und eine Entzündungsreaktion ausgelöst (137).

Das würde für die Ergebnisse der hier vorliegenden Promotion bedeuten, dass GFAP-Autoantikörper erst nach Übertritt durch die Blut-Hirn-Schranke und Kontakt mit GFAP eine pathogene Wirkung entfalten könnten. Das Vorhandensein von anti-GFAP an sich würde demnach noch keine nachteiligen Effekten für den Organismus erwarten lassen.

5.4 GFAP-Autoantikörper als Marker für neurokognitive Defizite bei PLWH

Die Experimente für diese Promotion zeigten, dass die Areale im Hirnstamm signifikant stärkere anti-GFAP Signale erzeugten als die Kortexareale. Auch Martin und O'Callaghan zeigten, dass im Kortex im Vergleich zu anderen Teilen des Gehirns die niedrigsten GFAP-Konzentrationen herrschen (110). Vorstellbar wäre, dass die bereits erwähnten pathogenen Effekte der GFAP-Autoantikörper (siehe Kapitel 5.3.4) auf Grund des relativen GFAP-Mangels zuerst im Kortex ihre volle Wirkung entfalten. Auch die Ergebnisse der Korrelationen der neurokognitiven Tests mit den anti-GFAP Signalstärken würden zu dieser Vermutung passen. Die Punktzahl des MMS zeigte eine signifikante negative Korrelation mit der anti-GFAP Signalintensität der Areale DM, ST, MC, FC und SN. Je stärker also das Signal der GFAP-Autoantikörper, desto geringer die MMS-Punktzahl. Beim Mini Mental State Test wird die allgemeine kognitive Performance evaluiert, dazu gehören u.a. die Domänen Aufmerksamkeit, Orientierung und Gedächtnis (104). Viele dieser Funktionen werden federführend vom präfrontalen Kortex aus gesteuert oder beeinflusst (138). Auch die Ergebnisse des TMT A korrelieren signifikant und stark mit den Antikörpersignalen aller Areale außer DM. Das DM-Signal korreliert moderat positiv mit den TMT A Ergebnissen. Beim Trail Making Test werden die Aufmerksamkeit, exekutive Funktionen und die visuell-motorische Geschwindigkeit getestet (105), indem Zahlen auf einem Blatt Papier in aufsteigender Reihenfolge miteinander verbunden werden müssen. Die Zeit bis zur Erfüllung der Aufgabe wird gestoppt. Ein schlechtes Abschneiden wird bei diesem Test folglich durch einen langen Zeitraum angezeigt. Dementsprechend korrelieren die Ergebnisse des TMT A positiv mit den GFAP-Autoantikörpersignalen der Areale. Diese Ergebnisse könnten darauf hinweisen,

Diskussion

dass die GFAP-Autoantikörpermenge ein Marker für die Ausprägung des neurokognitiven Defizites ist.

Die beiden Forscherinnen Colasanti und Barbati veröffentlichten im Jahr 2010 ein Paper zu Autoantikörpern bei Menschen mit Alzheimer (139). In dieser Arbeit deuten sie an, dass Autoantikörper nicht nur als Biomarker der Demenzausprägung, sondern auch als Prädiktor eines Fortschreitens der Demenz dienen könnten (139). Auch bei Zhang und Zoltewicz finden sich derartige Hinweise (100). Sie beschreiben in ihrem 2014 veröffentlichten Artikel den potentiellen Nutzen von GFAP-Autoantikörpern bei der Diagnostik von subakuten Schädelhirntraumata (SHT) (100). Sie fanden heraus, dass im Schnitt sieben Tage nach einem SHT vergingen, bis GFAP-Autoantikörper vom IgG-Typ im Blut nachweisbar waren (100). Die Menge an Autoantikörpern an Tag 4 bis 10 korrelierte signifikant mit der GFAP-Menge am ersten Tag nach SHT (100). Es wurden jedoch Unterschiede in der individuellen Antikörpermenge gefunden (100). Sie untersuchten Menschen mit SHT und quantifizierten den klinischen Zustand mit Hilfe der *Glascow Coma Scale* (GCS) (100). Eine höhere Punktzahl entsprach einem weniger schwerwiegenden Trauma. Menschen mit hohen Punktzahlen auf der GCS hatten signifikant weniger GFAP-Autoantikörper im Blut. Bemerkenswerterweise hatten Patienten und Patientinnen mit einem schlechten Outcome ein signifikant höheres GFAP-Autoantikörperlevel (100), was ebenfalls für gewisse prädiktive Eigenschaften der Antikörper sprechen könnte. In dieser Hinsicht sind noch weitere Studien nötig, um die Rolle von GFAP-Autoantikörpern genauer ergründen zu können.

5.5 Methodische Analyse

Die HAND-1 Studie und die hier vorliegende Promotion haben Limitationen. Zunächst ist die untersuchte Stichprobe mit 35 Mitgliedern klein und die Kontrollgruppe ist mit 12 Teilnehmenden kleiner als die HIV-Gruppe mit 23 Teilnehmenden. Die demographischen Merkmale wie Alter, Geschlecht und Bildung sind in den beiden Studiengruppen nicht vollkommen ausgeglichen verteilt. Die Tatsache, dass deutlich weniger Probenmaterial des Gehirnareals LC zur Verfügung stand, erschwert die Einordnung der Ergebnisse dieses Areals.

Diskussion

Zudem weicht die Durchführung des MMS in der HAND-1 Studie vom üblichen Ablauf ab, das schränkt die Vergleichbarkeit mit anderen Studien ein. Außerdem werden weitere Daten zur Validität der neurokognitiven Tests für das Setting in Tansania benötigt, insbesondere im Hinblick auf die Teilnahme von Analphabeten und etwaige kulturelle Unterschiede. Die Durchführung der Western Blots erfolgte aus Platzgründen ohne einen Housekeeper bzw. eine hausinterne Kontrolle. Allerdings handelt es sich nicht um eine quantitative Studie, daher ist diese Limitation eher zweitrangig.

Diese Promotion ist jedoch, unseres Wissens nach, die bis dato erste Veröffentlichung, in der GFAP-Autoantikörper bei Menschen mit HIV gemessen wurden. Dieses Alleinstellungsmerkmal wird ergänzt durch die Tatsache, dass signifikante Korrelationen zwischen den anti-GFAP Leveln und den Ergebnissen der neurokognitiven Tests gefunden wurden. GFAP-Autoantikörper könnten sich demnach als diagnostischer oder prognostischer Marker für das Vorhandensein und die Ausprägung eines neurokognitiven Defizites bei HAND eignen. Klinisch besteht ein Bedarf an solchen Markern, insbesondere zur Differenzierung zwischen HAND und anderen Demenzvarianten bei einer alternden Zielgruppe. Wir hoffen, künftig mehr Forschungsarbeiten zu HIV und anti-GFAP zu begegnen, um die Versorgung von Menschen, die mit HIV und HAND leben weiter zu verbessern.

6. Zusammenfassung

Hintergrund: Das saure Gliafaserprotein (GFAP) kommt im ZNS vor allem in Astrozyten vor und spielt eine Rolle bei der Astrozytose, die wiederum ist ein pathogenetisches Merkmal von HIV-assoziierten neurologischen Erkrankungen (HAND). In dieser Arbeit wird das Vorkommen von GFAP-Autoantikörpern bei PLWH und deren Bedeutung bei der Entstehung von HAND untersucht. Außerdem wird eruiert, ob GFAP-Autoantikörper als Marker eines neurokognitiven Defizites bei HAND in Frage kommen.

Methoden: Homogenisiert Gewebeschnitte von verschiedenen Gehirnareale wurden mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot auf Membranen übertragen. Diese Membranen wurden mit Blutproben aus der HAND-1 Studie inkubiert. Der Nachweis von GFAP-Antikörpern erfolgte indirekt mittels eines IgG-Antikörpers. Die Anti-GFAP Signalintensitäten wurden semiquantitativ ausgewertet und mit den Daten der neurokognitiven Test der HAND-1 Studie korreliert.

Ergebnisse: Die GFAP-Autoantikörper Signalintensität unterscheidet sich je nach Gehirnareal ($p < 0,0001$). Insbesondere die DM-Signale sind signifikant stärker als die der anderen Areale ($p < 0,01$). Es lässt sich insgesamt kein signifikanter Unterschied in der Signalstärke zwischen Menschen mit HIV und Kontrollen feststellen ($p = 0,1742$). Bei der HIV-Gruppe zeigt das Gesamtergebnis des MMS einen signifikanten, negativen und starken Zusammenhang mit der GFAP-Antikörpersignalintensität der Areale DM ($p = 0,004$), ST ($p = 0,011$), MC ($p = 0,007$) und FC ($p = 0,002$). Es konnten keine signifikanten Korrelationen zwischen den CD4-Zellzahlen und den Anti-GFAP Signalintensitäten festgestellt werden. Bei der Kontrollgruppe fanden sich lediglich vereinzelt signifikante Korrelationen.

Diskussion: Diese Promotion ist die bis dato erste Veröffentlichung, in der GFAP-Autoantikörper bei Menschen mit HIV gemessen wurden. Dass kein Unterschied im Vorkommen von GFAP-Ak bei PLWH und der Kontrollgruppe gefunden wurde, könnte an der geringen Teilnehmendenzahl oder am Mangel von Teilnehmenden mit HAD liegen. Andererseits könnte es auch dafür sprechen, dass anti-GFAP nicht obligat pathogen ist, sondern erst nach Übertritt über die Blut-Hirn-Schranke pathologische Folgen hat. Für diese Hypothese spricht die Erkenntnis, dass eine höhere Menge von GFAP-Ak mit einem schlechteren Abschneiden bei neurokognitiven Tests korreliert. Demnach könnten sich GFAP-Autoantikörper als diagnostische und möglicherweise prognostische Marker eines neurokognitiven Defizites bei HAND eignen.

7. Abstract

Background: The glial fibrillary acidic protein (GFAP) is the most important structural protein of astrocytes. It plays a role in the process of astrogliosis, which is a response of astrocytes to injury that is pathogenic for HIV associated neurological diseases (HAND). This dissertation aims to examine the presence of GFAP autoantibodies in people living with HIV (PLWH) and the antibodies' role in the development of HAND.

Methods: Tissue sections of different brain areas were homogenized. Using SDS-Gelelectrophoresis and Western Blotting the proteins were then transferred onto membranes. Those membranes were incubated with blood samples from the HAND-1 study. A specific IgG antibody was used to detect GFAP antibodies. The anti-GFAP signals were evaluated with a semiquantitative method and correlated with data from neurocognitive tests done for the HAND-1 study.

Results: Overall, there was no significant difference in anti-GFAP signal strength between PLWH and members of the control group ($p = 0,1742$). The intensity of the GFAP autoantibody signal differed depending on the brain area ($p < 0,0001$). The signals from the medulla oblongata region were significantly stronger than those from other areas ($p < 0,01$). There was a significant and strong negative correlation between the results of the neurocognitive tests and the intensity of the GFAP autoantibody signal. There was no significant correlation between the CD4 cell count and the GFAP antibody signal level.

Discussion: To the best of our knowledge, this is the first time anti-GFAP was measured in PLWH. There was no significant difference in the amount of anti-GFAP found in PLWH and members of the control group. This could be due to the limited number of study participants or participants with HIV associated dementia (HAD). However, we hypothesize that GFAP autoantibodies are not intrinsically toxic but that they could have pathologic effects once they cross the blood brain barrier. The finding that the amount of GFAP antibodies correlates with the severity of the neurocognitive deficit supports this hypothesis. Due to this correlation GFAP antibodies are worth considering as a diagnostic and prognostic biomarker of neurocognitive deficits in people with HAND.

Literaturverzeichnis

8. Literaturverzeichnis

1. U.S. Department of Health & Human Services. A Timeline of HIV and AIDS 2019 [Available from: <https://www.hiv.gov/hiv-basics/overview/history/hiv-and-aids-timeline>].
2. MS Gottlieb, HM Schanker, PT Fan, A Saxon, JD Weisman, I Pozalski. Pneumocystis Pneumonia - Los Angeles 1981 [updated 16. Juni 2001. Available from: https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/june_5.htm].
3. Prevention CfDCA. A cluster of Kaposi's sarcoma and Pneumocystis carinii pneumonia among homosexual male residents of Los Angeles and Orange Counties, California. MMWR Morbidity and mortality weekly report. 1982;31(23):305-7.
4. Prevention CfDCA. Current Trends Update on Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) --United States. MMWR Morbidity and mortality weekly report. 1982;31(37):505-8, 13-14.
5. Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science (New York, NY). 1983;220(4599):868-71.
6. Noble Media. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2008 www.nobelprize.org2020 [Available from: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2008/summary/>].
7. WHO. HIV/AIDS Fact Sheet [webpage]. 2019 [updated 25.07.2019. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>].
8. Robert Koch Institut. Schätzung der Zahl der HIV-Neuinfektionen und der Gesamtzahl von Menschen mit HIV in Deutschland 2018 [updated 4. Februar 2019. Available from: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2018/Ausgaben/47_18.pdf?_blob=publicationFile].
9. UNAIDS. People living with HIV receiving ART (%) 2018 [Available from: <http://aidsinfo.unaids.org>].
10. Azevedo-Pereira JM, Santos-Costa Q. HIV Interaction With Human Host: HIV-2 As a Model of a Less Virulent Infection. AIDS Rev. 2016;18(1):44-53.
11. Modrow S, Falke D, Truyen U, Schätzl H. Viren mit einzelsträngigem RNA-Genom und doppelsträngiger DNA als Zwischenprodukt. Molekulare Virologie. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2010. p. 409-59.
12. Mourez T, Simon F, Plantier JC. Non-M variants of human immunodeficiency virus type 1. Clin Microbiol Rev. 2013;26(3):448-61.

Literaturverzeichnis

13. Désiré N, Cerutti L, Le Hingrat Q, Perrier M, Emler S, Calvez V, et al. Characterization update of HIV-1 M subtypes diversity and proposal for subtypes A and D sub-subtypes reclassification. *Retrovirology*. 2018;15(1):80.
14. Chin BS. Molecular Epidemiology of Human Immunodeficiency Virus. *Infect Chemother*. 2017;49(1):1-9.
15. Burke DS. Recombination in HIV: an important viral evolutionary strategy. *Emerg Infect Dis*. 1997;3(3):253-9.
16. Cuevas JM, Geller R, Garijo R, López-Aldeguer J, Sanjuán R. Extremely High Mutation Rate of HIV-1 In Vivo. *PLoS Biol*. 2015;13(9):e1002251.
17. Zhou BY, Liu Y, Kim Bo, Xiao Y, He JJ. Astrocyte activation and dysfunction and neuron death by HIV-1 Tat expression in astrocytes. *Mol Cell Neurosci*. 2004;27(3):296-305.
18. Lucas S, Nelson AM. HIV and the spectrum of human disease. *The Journal of Pathology*. 2015;235(2):229-41.
19. National Institute of Allergy and Infectious Diseases. HIV Replication Cycle 2018 [updated 19.06.2018. Available from: <https://www.niaid.nih.gov/diseases-conditions/hiv-replication-cycle>.
20. Warpakowski A. CCR5-Antagonist: Wie HIV am Eintritt in die Zelle gehindert wird. *Dtsch Arztebl International*. 2005;102(19):A-1400.
21. O'Neil PK, Sun G, Yu H, Ron Y, Dougherty JP, Preston BD. Mutational analysis of HIV-1 long terminal repeats to explore the relative contribution of reverse transcriptase and RNA polymerase II to viral mutagenesis. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(41):38053-61.
22. Barmeyer A, Behrens G, Berzow D, Boesecke C, Braun P, Buhk T, et al. HIV-Buch 2018/19: Christian Hoffmann
Jürgen K. Rockstroh; 2018.
23. Mukhopadhyay P, Kumar V, Rathi M, Kohli HS, Jha V, Sakhuja V. Transmission of human immunodeficiency virus infection by renal transplantation. *Indian J Nephrol*. 2012;22(2):133-5.
24. Ahn J, Cohen SM. Transmission of human immunodeficiency virus and hepatitis C virus through liver transplantation. *Liver Transpl*. 2008;14(11):1603-8.
25. Simonds RJ, Holmberg SD, Hurwitz RL, Coleman TR, Bottenfield S, Conley LJ, et al. Transmission of human immunodeficiency virus type 1 from a seronegative organ and tissue donor. *The New England journal of medicine*. 1992;326(11):726-32.

Literaturverzeichnis

26. HIV TWGoM-T-CTo. Rates of mother-to-child transmission of HIV-1 in Africa, America, and Europe: results from 13 perinatal studies. The Working Group on Mother-To-Child Transmission of HIV. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1995;8(5):506-10.
27. Kourtis AP, Lee FK, Abrams EJ, Jamieson DJ, Bulterys M. Mother-to-child transmission of HIV-1: timing and implications for prevention. *Lancet Infect Dis.* 2006;6(11):726-32.
28. Nduati R, John G, Mbori-Ngacha D, Richardson B, Overbaugh J, Mwatha A, et al. Effect of breastfeeding and formula feeding on transmission of HIV-1: a randomized clinical trial. *JAMA.* 2000;283(9):1167-74.
29. Deutsche AIDS-Gesellschaft (DAIG). Deutsch-Österreichische Leitlinie zur HIV-Therapie in der Schwangerschaft und bei HIV- exponierten Neugeborenen 2017 [updated März 2017. Available from: [https://daignet.de/site-content/hiv-leitlinien/leitlinien-1/Deutsch Osterreichische%20Leitlinie%20zur%20HIV Therapie%20in%20der%20Schwangerschaft%20und%20bei%20HIV exponierten%20Neugeborenen%20Stand%20Marz%202017.pdf](https://daignet.de/site-content/hiv-leitlinien/leitlinien-1/Deutsch%20Osterreichische%20Leitlinie%20zur%20HIV%20Therapie%20in%20der%20Schwangerschaft%20und%20bei%20HIV%20exponierten%20Neugeborenen%20Stand%20Marz%202017.pdf).
30. Doitsh G, Galloway NLK, Geng X, Yang Z, Monroe KM, Zepeda O, et al. Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. *Nature.* 2014;505(7484):509-14.
31. Robert Koch Institut. RKI-Ratgeber HIV-Infektion/AIDS 2018 [updated 22.11.2018. Available from: [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber HIV AIDS.html#doc2374480bodyText24](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_HIV_AIDS.html#doc2374480bodyText24).
32. Richard M. Selik, Eve D. Mokotoff, Bernard Branson, S. Michele Owen, Suzanne Whitmore, H. Irene Hall. Revised Surveillance Case Definition for HIV Infection — United States, 2014 2014 [Available from: https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr6303a1.htm?s_cid=rr6303a1_e.
33. Deutsche AIDS-Gesellschaft (DAIG), Österreichischen AIDS-Gesellschaft (ÖAIG). Deutsch-Österreichische Leitlinien zur Therapie und Prophylaxe opportunistischer Infektionen bei HIV-infizierten erwachsenen Patienten 2014 [updated 12.09.2014. Available from: <https://daignet.de/site-content/hiv-leitlinien/leitlinien-1/LL%20OI%202014-2.pdf>.
34. Porter K, Johnson AM, Phillips AN, Darbyshire JH. The practical significance of potential biases in estimates of the AIDS incubation period distribution _in the UK Register of HIV Seroconverters. *AIDS.* 1999;13(14):1943-51.
35. Smith CJ, Ryom L, Weber R, Morlat P, Pradier C, Reiss P, et al. Trends in underlying causes of death in people with HIV from 1999 to 2011 (D:A:D): a multicohort collaboration. *The Lancet.* 2014;384(9939):241-8.

Literaturverzeichnis

36. Fabian J, Naicker S. HIV and kidney disease in sub-Saharan Africa. *Nature Reviews Nephrology*. 2009;5(10):591-8.
37. Naicker S, Rahmanian S, Kopp JB. HIV and chronic kidney disease. *Clin Nephrol*. 2015;83(7 Suppl 1):32-8.
38. Kenneth G. Castro, John W. Ward, Laurence Slutsker, James W. Buehler, Harold W. Jaffe, Ruth L. Berkelman, et al. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report Recommendations and reports*. 1992;41(RR-17):1-19.
39. Ganesan M, Poluektova LY, Kharbanda KK, Osna NA. Liver as a target of human immunodeficiency virus infection. *World J Gastroenterol*. 2018;24(42):4728-37.
40. Cihlar T, Fordyce M. Current status and prospects of HIV treatment. *Curr Opin Virol*. 2016;18:50-6.
41. Mahy M, Stover J, Stanecki K, Stoneburner R, Tassie J-M. Estimating the impact of antiretroviral therapy: regional and global estimates of life-years gained among adults. *Sex Transm Infect*. 2010;86 Suppl 2(Suppl_2):ii67-ii71.
42. Wandeler G, Johnson LF, Egger M. Trends in life expectancy of HIV-positive adults on antiretroviral therapy across the globe: comparisons with general population. *Curr Opin HIV AIDS*. 2016;11(5):492-500.
43. Cohen MS, Chen YQ, McCauley M, Gamble T, Hosseinipour MC, Kumarasamy N, et al. Prevention of HIV-1 Infection with Early Antiretroviral Therapy. *N Engl J Med*. 2011;365(6):493-505.
44. WHO. Antiretroviral treatment as prevention of HIV and TB. World Health Organization; 2012.
45. (DAIG) DA-G. Deutsch-Österreichische Leitlinien zur antiretroviralen Therapie der HIV-1-Infektion 2019 [updated 10.04.2019. Available from: <https://daignet.de/site-content/hiv-leitlinien/leitlinien-1/deutsch-oesterreichische-leitlinien-zur-antiretroviralen-therapie-der-hiv-1-infektion-1>.
46. Insight Start Study Group, Lundgren JD, Babiker AG, Gordin F, Emery S, Grund B, et al. Initiation of Antiretroviral Therapy in Early Asymptomatic HIV Infection. *The New England journal of medicine*. 2015;373(9):795-807.
47. Wallet C, De Rovere M, Van Assche J, Daouad F, De Wit S, Gautier V, et al. Microglial Cells: The Main HIV-1 Reservoir in the Brain. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019;9:362.

Literaturverzeichnis

48. Rosario C. Mata, Pompeyo Viciano, Aristides De Alarcón, Luis F. López-Cortés, Josefa Gómez-Vera, Mónica Trastoy, et al. Discontinuation of Antiretroviral Therapy in Patients with Chronic HIV Infection: Clinical, Virologic, and Immunologic Consequences. *AIDS Patient Care STDS*. 2005;19(9):550-62.
49. Marcello A. Latency: the hidden HIV-1 challenge. *Retrovirology*. 2006;3(1):7.
50. Julia Marsh Sung, David M. Margolis. HIV Persistence on Antiretroviral Therapy and Barriers to a Cure. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1075:165-85.
51. Chavez L, Calvanese V, Verdin E. HIV Latency Is Established Directly and Early in Both Resting and Activated Primary CD4 T Cells. *PLoS Pathog*. 2015;11(6):e1004955.
52. Cenker JJ, Stultz RD, McDonald D. Brain Microglial Cells Are Highly Susceptible to HIV-1 Infection and Spread. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2017;33(11):1155-65.
53. Zaikos TD, Terry VH, Sebastian Kettinger NT, Lubow J, Painter MM, Virgilio MC, et al. Hematopoietic Stem and Progenitor Cells Are a Distinct HIV Reservoir that Contributes to Persistent Viremia in Suppressed Patients. *Cell Rep*. 2018;25(13):3759-73.e9.
54. Kandathil AJ, Sugawara S, Balagopal A. Are T cells the only HIV-1 reservoir? *Retrovirology*. 2016;13(1):86-.
55. Deutsche AIDS-Gesellschaft (DAIG). Deutsch-Österreichische Leitlinien zur HIV-Präexpositionsprophylaxe 2018 [updated 24.05.2018. Available from: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/055-008l_S2k_HIV-Präexpositionsprophylaxe_2019-01_01.pdf.
56. Anderson PL, Glidden DV, Liu A, Buchbinder S, Lama JR, Guanira JV, et al. Emtricitabine-tenofovir concentrations and pre-exposure prophylaxis efficacy in men who have sex with men. *Sci Transl Med*. 2012;4(151):151ra25-ra25.
57. Deutsche AIDS-Gesellschaft (DAIG). Deutsch-Österreichische Leitlinien zur Postexpositionellen Prophylaxe der HIV-Infektion (update 2018) 2018 [updated 01.04.2018. Available from: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/055-004l_S2k_Medikamentöse-Postexpositionsprophylaxe-PEP-nach-HIV-Exposition_2018-12.pdf.
58. Whitney JB, Hill AL, Sanisetty S, Penaloza-MacMaster P, Liu J, Shetty M, et al. Rapid seeding of the viral reservoir prior to SIV viraemia in rhesus monkeys. *Nature*. 2014;512(7512):74-7.
59. Resnick L, Berger JR, Shapshak P, Tourtellotte WW. Early penetration of the blood-brain-barrier by HIV. *Neurology*. 1988;38(1):9-14.

Literaturverzeichnis

60. Williams DW, Eugenin EA, Calderon TM, Berman JW. Monocyte maturation, HIV susceptibility, and transmigration across the blood brain barrier are critical in HIV neuropathogenesis. *J Leukoc Biol.* 2012;91(3):401-15.
61. Rojas-Celis V, Valiente-Echeverria F, Soto-Rifo R, Toro-Ascuy D. New Challenges of HIV-1 Infection: How HIV-1 Attacks and Resides in the Central Nervous System. *Cells.* 2019;8(10).
62. Dohgu S, Ryerse JS, Robinson SM, Banks WA. Human immunodeficiency virus-1 uses the mannose-6-phosphate receptor to cross the blood-brain barrier. *PLoS One.* 2012;7(6):e39565-e.
63. Navia BA, Cho ES, Petito CK, Price RW. The AIDS dementia complex: II. Neuropathology. *Ann Neurol.* 1986;19(6):525-35.
64. Anders KH, Guerra WF, Tomiyasu U, Verity MA, Vinters HV. The neuropathology of AIDS. UCLA experience and review. *The American journal of pathology.* 1986;124(3):537-58.
65. Tan IL, Smith BR, von Geldern G, Mateen FJ, McArthur JC. HIV-associated opportunistic infections of the CNS. *The Lancet Neurology.* 2012;11(7):605-17.
66. Antinori A, Arendt G, Becker JT, Brew BJ, Byrd DA, Cherner M, et al. Updated research nosology for HIV-associated neurocognitive disorders. *Neurology.* 2007;69(18):1789-99.
67. Heaton RK, Clifford DB, Franklin DR, Jr., Woods SP, Ake C, Vaida F, et al. HIV-associated neurocognitive disorders persist in the era of potent antiretroviral therapy: CHARTER Study. *Neurology.* 2010;75(23):2087-96.
68. Hong S, Banks WA. Role of the immune system in HIV-associated neuroinflammation and neurocognitive implications. *Brain Behav Immun.* 2015;45:1-12.
69. Eggers C, Arendt G, Hahn K, Husstedt IW, Maschke M, Neuen-Jacob E, et al. HIV-1-associated neurocognitive disorder: epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *J Neurol.* 2017;264(8):1715-27.
70. Ances BM, Ellis RJ. Dementia and neurocognitive disorders due to HIV-1 infection. *Semin Neurol.* 2007;27(1):86-92.
71. Middeldorp J, Hol EM. GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol.* 2011;93(3):421-43.
72. Molofsky AV, Deneen B. Astrocyte development: A Guide for the Perplexed. *Glia.* 2015;63(8):1320-9.
73. Dossi E, Vasile F, Rouach N. Human astrocytes in the diseased brain. *Brain Res Bull.* 2018;136:139-56.

Literaturverzeichnis

74. Halassa MM, Florian C, Fellin T, Munoz JR, Lee S-Y, Abel T, et al. Astrocytic modulation of sleep homeostasis and cognitive consequences of sleep loss. *Neuron*. 2009;61(2):213-9.
75. Di Castro MA, Chuquet J, Liaudet N, Bhaukaurally K, Santello M, Bouvier D, et al. Local Ca²⁺ detection and modulation of synaptic release by astrocytes. *Nat Neurosci*. 2011;14(10):1276-84.
76. Spampinato SF, Merlo S, Sano Y, Kanda T, Sortino MA. Astrocytes contribute to A β -induced blood–brain barrier damage through activation of endothelial MMP9. *J Neurochem*. 2017;142(3):464-77.
77. Navarrete M, Cuartero MI, Palenzuela R, Draffin JE, Konomi A, Serra I, et al. Astrocytic p38 α MAPK drives NMDA receptor-dependent long-term depression and modulates long-term memory. *Nat Commun*. 2019;10(1):2968-.
78. McKeon A, Benarroch EE. Glial fibrillary acid protein. Functions and involvement in disease. 2018;90(20):925-30.
79. Di Pietro V, Amorini AM, Lazzarino G, Yakoub KM, D'Urso S, Lazzarino G, et al. S100B and Glial Fibrillary Acidic Protein as Indexes to Monitor Damage Severity in an In Vitro Model of Traumatic Brain Injury. *Neurochem Res*. 2015;40(5):991-9.
80. Crols R, Saerens J, Noppe M, Lowenthal A. Increased GFAP levels in CSF as a marker of organicity in patients with Alzheimer's disease and other types of irreversible chronic organic brain syndrome. *J Neurol*. 1986;233(3):157-60.
81. Abdelhak A, Huss A, Kassubek J, Tumani H, Otto M. Serum GFAP as a biomarker for disease severity in multiple sclerosis. *Sci Rep*. 2018;8(1):14798-.
82. Vitkovic L, da Cunha A. Role for astrocytosis in HIV-1-associated dementia. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1995;202:105-16.
83. McCall MA, Gregg RG, Behringer RR, Brenner M, Delaney CL, Galbreath EJ, et al. Targeted deletion in astrocyte intermediate filament (Gfap) alters neuronal physiology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(13):6361-6.
84. Messing A. Refining the concept of GFAP toxicity in Alexander disease. *J Neurodev Disord*. 2019;11(1):27-.
85. Brenner M, Johnson AB, Boespflug-Tanguy O, Rodriguez D, Goldman JE, Messing A. Mutations in GFAP, encoding glial fibrillary acidic protein, are associated with Alexander disease. *Nat Genet*. 2001;27(1):117-20.
86. Rodriguez D, Gauthier F, Bertini E, Bugiani M, Brenner M, N'Guyen S, et al. Infantile Alexander disease: spectrum of GFAP mutations and genotype-phenotype correlation. *Am J Hum Genet*. 2001;69(5):1134-40.

Literaturverzeichnis

87. Prust M, Wang J, Morizono H, Messing A, Brenner M, Gordon E, et al. GFAP mutations, age at onset, and clinical subtypes in Alexander disease. *Neurology*. 2011;77(13):1287-94.
88. Springer S, Erlewein R, Naegele T, Becker I, Auer D, Grodd W, et al. Alexander disease--classification revisited and isolation of a neonatal form. *Neuropediatrics*. 2000;31(2):86-92.
89. Kim BO, Liu Y, Ruan Y, Xu ZC, Schantz L, He JJ. Neuropathologies in transgenic mice expressing human immunodeficiency virus type 1 Tat protein under the regulation of the astrocyte-specific glial fibrillary acidic protein promoter and doxycycline. *The American journal of pathology*. 2003;162(5):1693-707.
90. Fan Y, He JJ. HIV-1 Tat Induces Unfolded Protein Response and Endoplasmic Reticulum Stress in Astrocytes and Causes Neurotoxicity through Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) Activation and Aggregation. *The Journal of biological chemistry*. 2016;291(43):22819-29.
91. Iorio R, Damato V, Evoli A, Gessi M, Gaudino S, Di Lazzaro V, et al. Clinical and immunological characteristics of the spectrum of GFAP autoimmunity: a case series of 22 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2018;89(2):138-46.
92. Sasaki K, Bean A, Shah S, Schutten E, Huseby PG, Peters B, et al. Relapsing-remitting central nervous system autoimmunity mediated by GFAP-specific CD8 T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2014;192(7):3029-42.
93. Flanagan EP, Hinson SR, Lennon VA, Fang B, Aksamit AJ, Morris PP, et al. Glial fibrillary acidic protein immunoglobulin G as biomarker of autoimmune astrocytopathy: Analysis of 102 patients. *Ann Neurol*. 2017;81(2):298-309.
94. Yang X, Liang J, Huang Q, Xu H, Gao C, Long Y, et al. Treatment of Autoimmune Glial Fibrillary Acidic Protein Astrocytopathy: Follow-Up in 7 Cases. *Neuroimmunomodulation*. 2017;24(2):113-9.
95. Zekeridou A, McKeon A, Flanagan EP. A path to understanding autoimmune GFAP astrocytopathy. *Eur J Neurol*. 2018;25(3):421-2.
96. Braak H, Ghebremedhin E, Rüb U, Bratzke H, Del Tredici K. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res*. 2004;318(1):121-34.
97. Trepel M, Dalkowski K. *Neuroanatomie : Struktur und Funktion*. Philadelphia, GERMANY: Urban & Fischer Verlag GmbH & Co. KG; 2017.
98. Pschyrembel Online. Artikel „Mesocortex“ Berlin: Verlag Walter de Gruyter; [updated April 2016. Available from: <https://www.pschyrembel.de/Mesocortex/K00QC>.

Literaturverzeichnis

99. Gschmack EM. Anti-Gehirn-Autoantikörper und deren Bedeutung bei Morbus Parkinson. Würzburg2016. 160 Blätter p.
100. Zhang Z, Zoltewicz JS, Mondello S, Newsom KJ, Yang Z, Yang B, et al. Human traumatic brain injury induces autoantibody response against glial fibrillary acidic protein and its breakdown products. PLoS One. 2014;9(3):e92698.
101. Newcombe J, Woodroffe MN, Cuzner ML. Distribution of Glial Fibrillary Acidic Protein in Gliosed Human White Matter. J Neurochem. 1986;47(6):1713-9.
102. Scholler M. Daytime sleepiness and cognitive impairment of HIV-patients in Tanzania. 2012.
103. Kersting L. Prävalenz HIV-assoziierter neurokognitiver Störungen unter Patienten einer HIV- Ambulanz eines Referenzkrankenhauses in Tansania HAND-1 Studie. Würzburg2017. IV, 112 Seiten p.
104. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state": A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. J Psychiatr Res. 1975;12(3):189-98.
105. Sánchez-Cubillo I, Periáñez JA, Adrover-Roig D, Rodríguez-Sánchez JM, Ríos-Lago M, Tirapu J, et al. Construct validity of the Trail Making Test: role of task-switching, working memory, inhibition/interference control, and visuomotor abilities. J Int Neuropsychol Soc. 2009;15(3):438-50.
106. Cohen J. Statistical power analysis for the behavioral sciences. 2. ed. ed. Hillsdale, NJ [u.a.]: Erlbaum; 1988.
107. Gschmack E, Monoranu CM, Marouf H, Meyer S, Lessel L, Idris R, et al. Plasma autoantibodies to glial fibrillary acidic protein (GFAP) react with brain areas according to Braak staging of Parkinson's disease. J Neural Transm (Vienna). 2022;129(5-6):545-55.
108. Sporer B, Missler U, Magerkurth O, Koedel U, Wiesmann M, Pfister HW. Evaluation of CSF glial fibrillary acidic protein (GFAP) as a putative marker for HIV-associated dementia. Infection. 2004;32(1):20-3.
109. Andersson LM, Fredman P, Lekman A, Rosengren L, Gisslén M. Increased cerebrospinal fluid ganglioside GD3 concentrations as a marker of microglial activation in HIV type 1 infection. AIDS Res Hum Retroviruses. 1998;14(12):1065-9.
110. Martin PM, O'Callaghan JP. A direct comparison of GFAP immunocytochemistry and GFAP concentration in various regions of ethanol-fixed rat and mouse brain. J Neurosci Methods. 1995;58(1-2):181-92.

Literaturverzeichnis

111. Kálmán M, Hajós F. Distribution of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-immunoreactive astrocytes in the rat brain. I. Forebrain. *Exp Brain Res.* 1989;78(1):147-63.
112. Hajós F, Kálmán M. Distribution of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-immunoreactive astrocytes in the rat brain. II. Mesencephalon, rhombencephalon and spinal cord. *Exp Brain Res.* 1989;78(1):164-73.
113. Taft JR, Vertes RP, Perry GW. Distribution of GFAP+ Astrocytes in Adult and Neonatal Rat Brain. *Int J Neurosci.* 2005;115(9):1333-43.
114. Rodríguez JJ, Yeh C-Y, Terzieva S, Olabarria M, Kulijewicz-Nawrot M, Verkhatsky A. Complex and region-specific changes in astroglial markers in the aging brain. *Neurobiol Aging.* 2014;35(1):15-23.
115. Matias I, Morgado J, Gomes FCA. Astrocyte Heterogeneity: Impact to Brain Aging and Disease. *Front Aging Neurosci.* 2019;11(59).
116. Oberheim NA, Takano T, Han X, He W, Lin JHC, Wang F, et al. Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2009;29(10):3276-87.
117. Yang Z, Wang KKW. Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends Neurosci.* 2015;38(6):364-74.
118. Mecocci P, Parnetti L, Romano G, Scarelli A, Chionne F, Cecchetti R, et al. Serum anti-GFAP and anti-S100 autoantibodies in brain aging, Alzheimer's disease and vascular dementia. *J Neuroimmunol.* 1995;57(1):165-70.
119. Tanaka J, Nakamura K, Takeda M, Tada K, Suzuki H, Morita H, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for human autoantibody to glial fibrillary acidic protein: higher titer of the antibody is detected in serum of patients with Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand.* 1989;80(6):554-60.
120. Poletaev AB, Morozov SG, Gnedenko BB, Zlunikin VM, Korzhenevsky DA. Serum Anti-S100b, Anti-GFAP and Anti-NGF Autoantibodies of IgG Class in Healthy Persons and Patients with Mental and Neurological Disorders. *Autoimmunity.* 2000;32(1):33-8.
121. Bucciantini M, Giannoni E, Chiti F, Baroni F, Formigli L, Zurdo J, et al. Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature.* 2002;416(6880):507-11.
122. Soto C. Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience.* 2003;4(1):49-60.
123. Quinlan RA, Brenner M, Goldman JE, Messing A. GFAP and its role in Alexander disease. *Exp Cell Res.* 2007;313(10):2077-87.

Literaturverzeichnis

124. Mehrbod P, Ande SR, Alizadeh J, Rahimizadeh S, Shariati A, Malek H, et al. The roles of apoptosis, autophagy and unfolded protein response in arbovirus, influenza virus, and HIV infections. *Virulence*. 2019;10(1):376-413.
125. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2007;8(7):519-29.
126. Stahl D, Lacroix-Desmazes S, Misra N, Karmochkine M, Kaveri SV, Costagliola D, et al. Alterations of self-reactive antibody repertoires in HIV disease: an insight into the role of T cells in the selection of autoreactive B cells. *Immunol Lett*. 2005;99(2):198-208.
127. Gravier-Dumonceau A, Ameli R, Rogemond V, Ruiz A, Joubert B, Muñiz-Castrillo S, et al. Glial Fibrillary Acidic Protein Autoimmunity: A French Cohort Study. *Neurology*. 2022;98(6):e653-e68.
128. Brentville VA, Vankemmelbeke M, Metheringham RL, Durrant LG. Post-translational modifications such as citrullination are excellent targets for cancer therapy. *Semin Immunol*. 2020;47:101393.
129. Jin Z, Fu Z, Yang J, Troncosco J, Everett AD, Van Eyk JE. Identification and characterization of citrulline-modified brain proteins by combining HCD and CID fragmentation. *Proteomics*. 2013;13(17):2682-91.
130. Romero V, Fert-Bober J, Nigrovic PA, Darrah E, Haque UJ, Lee DM, et al. Immune-mediated pore-forming pathways induce cellular hypercitrullination and generate citrullinated autoantigens in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med*. 2013;5(209):209ra150-209ra150.
131. Sullivan SM, Sullivan RK, Miller SM, Ireland Z, Björkman ST, Pow DV, et al. Phosphorylation of GFAP is associated with injury in the neonatal pig hypoxic-ischemic brain. *Neurochem Res*. 2012;37(11):2364-78.
132. Li T, Bourgeois J-P, Celli S, Glacial F, Le Sourd A-M, Mecheri S, et al. Cell-penetrating anti-GFAP VHH and corresponding fluorescent fusion protein VHH-GFP spontaneously cross the blood-brain barrier and specifically recognize astrocytes: application to brain imaging. *The FASEB Journal*. 2012;26(10):3969-79.
133. Poduslo JF, Curran GL, Berg CT. Macromolecular permeability across the blood-nerve and blood-brain barriers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(12):5705-9.
134. Banks WA, Terrell B, Farr SA, Robinson SM, Nonaka N, Morley JE. Passage of amyloid beta protein antibody across the blood-brain barrier in a mouse model of Alzheimer's disease. *Peptides*. 2002;23(12):2223-6.
135. Fang B, McKeon A, Hinson SR, Kryzer TJ, Pittock SJ, Aksamit AJ, et al. Autoimmune Glial Fibrillary Acidic Protein Astrocytopathy: A Novel Meningoencephalomyelitis. *JAMA Neurol*. 2016;73(11):1297-307.

Literaturverzeichnis

136. Nagele EP, Han M, Acharya NK, DeMarshall C, Kosciuk MC, Nagele RG. Natural IgG autoantibodies are abundant and ubiquitous in human sera, and their number is influenced by age, gender, and disease. *PLoS One*. 2013;8(4):e60726-e.
137. Kaneko Y, Nimmerjahn F, Ravetch JV. Anti-Inflammatory Activity of Immunoglobulin G Resulting from Fc Sialylation. *Science*. 2006;313(5787):670-3.
138. Chayer C, Freedman M. Frontal lobe functions. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2001;1(6):547-52.
139. Colasanti T, Barbati C, Rosano G, Malorni W, Ortona E. Autoantibodies in patients with Alzheimer's disease: pathogenetic role and potential use as biomarkers of disease progression. *Autoimmunity Reviews*. 2010;9(12):807-11.

Abkürzungsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis

% Vol.	Volumenprozent
AIDS	erworbenes Immundefizienzsyndrom
Ak	Antikörper
ANI	engl.: asymptomatic neurocognitive impairment
ART	engl.: antiretroviral therapy / dt.: antiretrovirale Therapie auch: cART (combined antiretroviral therapy)
BDP	engl.: break down products / dt.: Zerfallsprodukte
BMC	engl.: Bugando Medical Centre
BSL	engl.: bio safety level
CDC	engl.: Centers for Disease Control and Prevention
COPD	engl.: chronic obstructive pulmonary disease / dt.: chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CUHAS	engl.: Catholic University of Health and Allied Sciences
DM	dorsaler Motornukleus des N. Vagus
DST	engl.: Digit Span Test
ECL	engl.: enhanced chemiluminescence
ENV	engl.: envelop
ER	endoplasmatisches Retikulum
FC	engl.: first order sensory association areas
GCS	engl.: Glasgow Coma Scale
GFAP	engl.: glial fibrillary acidic protein / dt.: saures Gliafaserprotein
gp	Glykoprotein
h	Stunde(n)
HAART	engl.: highly active antiretroviral therapy / hochaktive antiretrovirale Therapie

Abkürzungsverzeichnis

HAD	engl.: HIV-associated dementia
HAND	engl.: HIV-associated neurocognitive disorders
HC	engl.: higher order sensory association areas
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HIVAN	HIV- assoziierte Nephropathie
HRP	engl.: horseradish / dt.: Meerrettichperoxidase
IADL	engl.: International Activities of Daily Life
IHDS	engl.: International HIV Dementia Scale
Ig	Immunglobulin
kDa	Kilodalton
LC	Locus Coeruleus / Subcoeruleus,
MC	temporal Mesocortex
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMSE	engl.: Mini-mental State Examination
MND	engl.: mild neurocognitive disorders
MSM	engl.: Men having sex with men
Nef	engl.: negative regulatory factor
PBS	engl.: phosphate buffered saline
PBT	engl.: Pegboard Test
PEP	Postexpositionsprophylaxe
PLWH	engl.: people living with HIV
PMTCT	engl.: prevention of mother-to-child transmission
PrEP	Präexpositionsprophylaxe
RKI	Robert Koch Institut
RNA	engl.: ribonucleic acid

Abkürzungsverzeichnis

Rpm	engl.: runs per minute / dt.: Umdrehungen pro Minute
S.	Seite
SHT	Schädelhirntrauma
SDS-PAGE	engl.: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis / dt.: Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SN	Substantia Nigra
ST	Striatum
STR	engl.: single tablet regimen
Tat	engl.: transactivator of transcription, Regulatorprotein des HI-Virus
TMT	engl.: Trail Making Test
UNAIDS	engl.: Joint United Nations Programme on HIV/AIDS
UPR	engl.: unfolded protein response
VPR	engl.: viral protein R
VFT	engl.: Verbal Fluency Test
WHO	engl.: World Health Organization
ZNS	zentrales Nervensystem
µl	Mikroliter

Abbildungsverzeichnis

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Aufbau des HI-Virus	4
Abbildung 2	Beispielhafte Auswertung einer Membran mit Hilfe des Image Studio Programms	28
Abbildung 3	Übersicht: welche Membranen wurden wie erstellt?	30
Abbildung 4	Schemazeichnung eines 9-Loch-Pegboards; eigene Darstellung	34
Abbildung 5	Bildungsjahre der Teilnehmenden.....	38
Abbildung 6	Übersicht: alle WB-Membranen der beiden Gruppen.....	40
Abbildung 7	Detailansicht einer Membran der Kontrollgruppe	41
Abbildung 8	Signifikante Unterschiede in der GFAP-Antikörper Signalintensität der verschiedenen Gehirnareale	44
Abbildung 9	Keine signifikanten Unterschiede in der GFAP-Antikörper Signalintensität von PLWH und Kontrollen.....	47
Abbildung 10	Lineare Regression des MMS und der Anti-GFAP Signale des DM-Areals (HIV/HAART).....	50
Abbildung 11	Lineare Regression des TMT und der Anti-GFAP Signale des DM-Areals (HIV/HAART).....	53

Tabellenverzeichnis

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Gehirnhomogenate, ihre Funktionen und ihre anatomische Lokalisation	23
Tabelle 2	Beladung der Gele	25
Tabelle 3	Aufbau Blotsandwich.....	25
Tabelle 4	Übersicht der neurokognitiven Tests und geprüften Fähigkeiten.....	35
Tabelle 5	Charakteristische Merkmale der Studiengruppen	37
Tabelle 6	Korrelationen HIV/HAART-Gruppe.....	48
Tabelle 7	Partialkorrelationen von MMS, Bildungsjahren und Anti-GFAP Signalstärken des DM-Areals (HIV/HAART)	51
Tabelle 8	Partialkorrelationen von MMS, Bildungsjahren und Anti-GFAP Signalstärken	52
Tabelle 9	Korrelationen Kontrollgruppe.....	54
Tabelle 10	Korrelationen der Anti-GFAP Signale mit den CD4+-Zellzahlen	56

Danksagung

IV. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Carsten Scheller für die Überlassung des Themas und die Betreuung dieser Arbeit, für die freundliche Hilfsbereitschaft während der experimentellen Phase und dem Verfassen dieser Arbeit, die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die Übernahme des Erstgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Thomas Dandekar danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ich bedanke mich bei den Arbeitsgruppen Scheller und Prof. Koutsilieri und den Bachelorstudierenden für ihre Hilfsbereitschaft und das freundliche Arbeitsklima. Dr. med. Kersting und Dr. rer. nat. Gschmack gebührt besonderer Dank für ihre freundliche Zusammenarbeit. Ihre Promotionen bildeten die wissenschaftliche Basis für meine Experimente, die meinige wäre ohne sie in dieser Form nicht möglich gewesen.

Außerdem bedanke ich mich bei Prof. Dr. Stich und Dr. med. Müller der tropenmedizinischen Abteilung der Missionsärztlichen Klinik Würzburg für die Bereitstellung der Daten zur HAND-1 Studie.