

Aus der Medizinischen Poliklinik - Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität

Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

Infektiologie

Leitender Oberarzt: Prof. Dr. med. Johannes Bogner

„Mitochondriale Dysfunktion bei chronischer Hepatitis B, chronischer
Hepatitis C und bei HIV-Postexpositionsprophylaxe“

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von

Jan Benedikt Erich Wilhelm Gröner

aus

Ulm

2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Johannes Bogner

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Dejana Mokranjac
Priv. Doz. Dr. Norbert Grüner

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. U. Seybold

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 13.10.2011

Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
Ag	Antigen
AK	Antikörper
ALT	Alanin-Aminotransferase
aP	Alkalische Phosphatase
Apaf	Apoptose-Proteasen aktivierender Faktor
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
CAD	Caspasen-aktivierte DNase
CCCP	Carbonylcyanid-p-chlorophenylhydrazon
CD	Cluster of Differentiation
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CK	Creatinkinase
C _{max}	Maximale Konzentration
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
COX	Cyclooxygenase
CRP	C-reaktives Protein
Da	Dalton
DED	Death Effector Domain
D(E)XA-Scan	Dual(-Energy) X-ray Absorptiometry
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dsDNA	Doppelstrang-Desoxyribonucleinsäure
EACS	European AIDS Clinical Society
EIA	Enzym-Immunoassay
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Reticulum
et al.	und andere
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FADD	Fas-Assoziierte Death Domain-Proteine
FasL	Fas-Ligand
Fc-Region	Fragment Crystallizable Region
FCCP	Trifluorcarbonylcyanidphenylhydrazon
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fl	Femtoliter
FSC	Forward scatter, Vorwärtsstreulicht
γ-GT	Gamma-Glutamyl-Transferase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase

GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
HAART	Highly Active Antiretroviral Therapy
Hb	Hämoglobin
HBc	Core Protein des Hepatitis B-Virus
HBe	Envelope Protein des Hepatitis B-Virus
HBs	Surface Protein des Hepatitis B-Virus
HBV	Hepatitis B-Virus
HBx	Protein X des Hepatitis B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Carcinom
HCV	Hepatitis C-Virus
HDL	High Density Lipoproteins
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	Human Immunodeficiency Virus
Hkt	Hämatokrit
IFN- α	Interferon-Alpha
IU	International Units
i.v.	Intravenös
JC-1	5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyaniniodid
KG	Körpergewicht
Kg	Kilogramm
KHK	Koronare Herzkrankheit
KI	Kontraindikation
LD	Lipodystrophie
LDH	Lactatdehydrogenase
LDL	Low Density Lipoproteins
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
MCH	Mean Corpuscular Hemoglobin
MCHC	Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration
MCV	Mean Cell Volume
MELAS	Mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes
MERRF	Myoclonic epilepsy with ragged red fibers
mg	Milligramm
ml	Milliliter
μ l	Microliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MMP, $\Delta\Psi_m$	Mitochondriales Membranpotential
mRNA	Messenger-Ribonucleinsäure
mtDNA	Mitochondriale Desoxyribonucleinsäure
mtPTP	Mitochondrial Permeability Transition Pore
NAD	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
nDNA	Nucleäre Desoxyribonucleinsäure

NISH	nicht-isotopische in situ Hybridisierung
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NNRTI	nicht-nucleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren
NRTI	Nucleosidische Reverse Transcriptase Inhibitoren
ORF	Open Reading Frame
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
Peg-IFN	Pegyliertes Interferon
PEP	Postexpositionsprophylaxe
PI	Propidiumiodid, Proteaseinhibitoren
PMA	Phorbol-12-myristinat-13-acetat
p53	Protein 53
Rb	Retinoblastom
RKI	Robert Koch Institut
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
ROS	Reactive Oxygen Species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Zellmedium)
rRNA	Ribosomale Ribonucleinsäure
RT/PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SSC	Side scatter, Seitwärtsstreulicht
SVR	Sustained virological response
TAG	Triacylglyceride
TMRM	Tetramethylrhodaminmethylester
TNF- α	Tumor-Nekrosefaktor Alpha
TPP ⁺	Tetraphenyl phosphonium
TRADD	TNF-R1-Associated Protein with Death Domains
tRNA	Transfer-Ribonucleinsäure
UV	Ultraviolett
Wo	Woche
ZNS	Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

I.....	X
I Einleitung.....	1
I.1 Mitochondriale Dysfunktion	1
I.2 Das Mitochondrium	2
I.2.1 Funktion	2
I.2.2 Aufbau	2
I.2.3 Die aerobe Energiegewinnung in der Atmungskette durch oxidative Phosphorylierung	3
I.2.4 Mechanismen der Entstehung einer mitochondrialen Dysfunktion durch NRTI.	5
I.2.5 Marker für mitochondriale Dysfunktion	6
I.3 Apoptose.....	7
I.3.1 Molekulare Mechanismen bei Apoptose.....	7
I.4 Hepatitis B.....	9
I.4.1 Epidemiologie, Verlauf der Infektion und Diagnostik.....	10
I.4.2 Erreger	12
I.4.3 Therapieindikationen	12
I.4.4 Therapie.....	13
I.4.5 Hepatitis B-Infektion und mitochondriale Dysfunktion.....	17
I.5 Hepatitis C	17
I.5.1 Epidemiologie und Verlauf der Infektion	17
I.5.2 Erreger	19
I.5.3 Diagnostik	20
I.5.4 Therapie.....	20
I.5.5 Hepatitis C-Infektion und mitochondriale Dysfunktion.....	23
I.6 HIV-Postexpositionsprophylaxe.....	25
I.6.1 Indikationen bei beruflicher Exposition	26
I.6.2 Indikationen bei nicht-beruflicher Exposition.....	26
I.6.3 Empfohlene Medikamente.....	27
I.7 Antivirale Therapie und mitochondriale Dysfunktion	28
I.7.1 Einfluss der NRTI auf die mitochondriale Funktion	28
I.7.2 Einfluss der Medikamente und der Infektion gemeinsam auf die mitochondriale Funktion	30
I.7.3 Einfluss von Proteaseinhibitoren auf die mitochondriale Funktion	32
I.7.4 Einfluss der HIV-Infektion per se auf die mitochondriale Funktion	33
I.7.5 Einfluss der NRTI ohne HIV-Infektion auf die mitochondriale Funktion.....	35

II	Ziele der Studie und Fragestellung	36
II.1.1	Hypothesen.....	36
II.1.2	Fragestellungen	37
III	Studiendesign, Studienteilnehmer, Material und Methoden	38
III.1	Studiendesign und Studienteilnehmer	38
III.1.1	Ethik.....	39
III.2	Material	40
III.2.1	Geräte.....	40
III.2.2	Pipetten.....	41
III.2.3	Software.....	41
III.2.4	Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Reagenzien	42
III.3	Methodik	44
III.3.1	Prinzip der Durchflusszytometrie.....	44
III.3.2	Analyse der durchflusszytometrisch erhobenen Daten.....	44
III.3.3	Automatisches Zellzählssystem Schärfe System GmbH CASY®1 Modell TT ...	45
III.3.4	Vorgehen bei der Messung	46
III.3.5	Auswertung.....	51
IV	Ergebnisse	57
IV.1	Studienteilnehmer, Zusammensetzung der einzelnen Kollektive, deskriptive Statistik..	57
IV.2	Zusammensetzung des Normalkollektivs und Matching mit den Patientenkollektiven ..	57
IV.3	Auswertung des Hepatitis B-Kollektivs.....	58
IV.3.1	Klinische Symptome der HBV-Patienten.....	58
IV.3.2	Medikation der HBV-Patienten.....	58
IV.3.3	Deskriptive Statistik des Hepatitis B-Kollektivs, der gematchten Normalkollektive und der Laborparameter	58
IV.4	Vergleichende Teste bei den Hepatitis B-Kollektiven	60
IV.4.1	Vergleich des Hepatitis-B-Kollektivs mit dem gematchten Normalkollektiv.....	60
IV.4.2	Vergleich der Patienten des HBV-Kollektivs, die zum Messzeitpunkt eine Therapie bekamen mit den untherapierten HBV-Patienten	62
IV.5	Auswertung des Hepatitis C-Kollektivs.....	64
IV.5.1	Klinische Symptome der HCV-Patienten.....	64
IV.5.2	Genotypen der Hepatitis C Viren	64
IV.5.3	Medikation und Nebenwirkungen der HCV-Patienten	64
IV.5.4	Deskriptive Statistik des Hepatitis C-Kollektivs, der gematchten Normalkollektive und der Laborparameter	65
IV.6	Vergleichende Teste bei den Hepatitis C-Kollektiven.....	67

IV.6.1	Vergleich des Hepatitis C-Kollektivs mit dem gematchten Normalkollektiv....	67
IV.6.2	Vergleich der Patienten des HCV-Kollektivs, die zum Messzeitpunkt eine Therapie bekamen mit den untherapierten HCV-Patienten	69
IV.6.3	Verlauf der mehrfach untersuchten Patienten unter der HCV-Therapie	73
IV.7	Studienteilnehmer, Zusammensetzung der einzelnen Kollektive und deren deskriptive Statistik: PEP-Kollektive	74
IV.7.1	Zusammensetzung des PEP-Kollektivs	74
IV.7.2	Für PEP gematchtes Normalkollektiv.....	75
IV.7.3	Deskriptive Statistik der PEP-Kollektive und der Laborparameter	75
IV.8	Vergleichende Teste PEP-Kollektive.....	80
IV.8.1	Beispielhafte Dot-Plots der JC-1-gefärbten PBMC.....	80
IV.8.2	Auswertung der mitochondrialen Membranpotentiale bei den HIV-PEP- Kollektiven	81
IV.8.3	Auswertung der Apoptoseraten des HIV-PEP-Kollektivs.....	84
IV.8.4	Subkohorte des HIV-PEP-Kollektivs, die Emtricitabin, Tenofovir und Lopinavir/Ritonavir erhielt	85
V	Diskussion	90
V.1	Mitochondriales Membranpotential und Apoptoserate der PBMC beim HBV-Kollektiv im Vergleich zum Normalkollektiv.....	91
V.2	Vergleich der MMPs und der Apoptoseraten bei therapierten und untherapierten Patienten des HBV-Kollektivs.....	95
V.3	Mitochondriales Membranpotential und Apoptoserate der PBMC beim HCV-Kollektiv im Vergleich zum Normalkollektiv.....	97
V.4	Vergleich des therapierten HCV-Kollektivs mit dem nicht therapierten HCV-Kollektiv	103
V.5	PEP-Kollektiv	106
V.6	Diskussion der Methodik	111
V.6.1	Einflussfaktoren auf das mitochondriale Membranpotential bzw. die Apoptoserate von PBMC	111
V.6.2	Validierung der Methode	113
V.6.3	Diskussion der Auswertung.....	119
V.7	Schlussfolgerung.....	120
VI	Zusammenfassung	123
VII	Danksagung	129
VIII	Lebenslauf	130
IX	Referenzen.....	132

Abbildung III-1	Dot-Plots der JC-1 gefärbten PBMC eines Normalprobanden	52
Abbildung III-2	Dot-Plots der Annexin-V-FITC- und PI-gefärbten PBMC.....	54
Abbildung IV-1	MMPs der isolierten PBMC. Vergleich des Hepatitis B-Kollektivs mit dem gematchten Normalkollektiv	60
Abbildung IV-2	Apoptoseraten der isolierten PBMC. Vergleich des Hepatitis B-Kollektivs mit dem gematchten Normalkollektiv	61
Abbildung IV-3	MMPs der PBMC. Vergleich der HBV-Patienten unter Therapie mit den zum Messzeitpunkt untherapierten Patienten.....	62
Abbildung IV-4	Apoptoseraten der PBMC. Vergleich der HBV-Patienten unter Therapie mit den zum Messzeitpunkt untherapierten Patienten.....	63
Abbildung IV-5	MMPs der isolierten PBMC. Vergleich des Hepatitis C-Kollektivs mit dem gematchten Normalkollektiv.....	67
Abbildung IV-6	Apoptoseraten der isolierten PBMC. Vergleich des Hepatitis C-Kollektivs mit dem gematchten Normalkollektiv	68
Abbildung IV-7	MMPs der PBMC. Vergleich der HCV-Patienten unter Therapie mit den zum Messzeitpunkt untherapierten Patienten	69
Abbildung IV-8	Apoptoseraten der PBMC. Vergleich der HCV-Patienten unter Therapie mit den zum Messzeitpunkt untherapierten Patienten.....	70
Abbildung IV-9	MMPs der PBMC. Vergleich der zum Messzeitpunkt untherapierten HCV-Patienten mit gematchten Normalprobanden	71
Abbildung IV-10	Mitochondriale Membranpotentiale der PBMC. Vergleich der HCV-Patienten unter Therapie mit gematchten Normalprobanden.....	72
Abbildung IV-11	Verlauf des MMP [FL-2/FL-1] unter Therapie mit Interferon- α und Ribavirin	73
Abbildung IV-12	Dot-Plots der JC-1-gefärbten PBMC (ohne Behandlung mit FCCP) eines PEP-Patienten.....	80
Abbildung IV-13	Dot-Plot der JC-1-gefärbten PBMC des PEP-Patienten (Lamivudin, Zidovudin und Lopinavir/Ritonavir) zur 4-Wochen-Kontrolle	81
Abbildung IV-14	Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials über die Zeit während der PEP-Einnahme.....	82
Abbildung IV-15	Vergleich der MMPs zwischen den einzelnen Messzeitpunkten und mit dem gematchten Normalkollektiv.....	83
Abbildung IV-16	Vergleich der Apoptoseraten zwischen den einzelnen Messzeitpunkten	84
Abbildung IV-17	Zunahme des prozentualen Anteils von Zellen mit vermindertem MMP während der PEP-Einnahme	88

Tabelle I-A	In Deutschland zugelassene Medikamente zur Behandlung der chronischen Hepatitis B.....	14
Tabelle I-B	In Deutschland zugelassene Medikamente zur Behandlung der chronischen Hepatitis C.....	21
Tabelle III-A	Geräte	40
Tabelle III-B	Pipetten	41
Tabelle III-C	Verbrauchsmaterialien	42
Tabelle III-D	Chemikalien und Reagenzien.....	43
Tabelle IV-A	Charakteristika und Laborwerte des Hepatitis B-Kollektivs	59
Tabelle IV-B	Vergleich MMPs HBV mit Normalkollektiv	60
Tabelle IV-C	Vergleich Apoptoseraten HBV mit Normalkollektiv	61
Tabelle IV-D	Vergleich MMPs HBV therapiert mit untherapiert	62
Tabelle IV-E	Vergleich Apoptoseraten HBV therapiert mit untherapiert	63
Tabelle IV-F	Charakteristika und Laborwerte des Hepatitis C-Kollektivs.....	66
Tabelle IV-G	Vergleich MMPs HCV mit Normalkollektiv	67
Tabelle IV-H	Vergleich Apoptoseraten HCV mit Normalkollektiv.....	68
Tabelle IV-I	Vergleich MMPs HCV therapiert mit untherapiert	69
Tabelle IV-J	Vergleich Apoptoseraten HCV therapiert mit untherapiert.....	70
Tabelle IV-K	Vergleich MMPs HCV untherapiert mit Normalkollektiv	71
Tabelle IV-L	Vergleich MMPs HCV therapiert mit Normalkollektiv	72
Tabelle IV-M	Teil 1 Charakteristika und Laborwerte der PEP-Kollektive	77
Tabelle IV-M	Teil 2 Laborwerte der PEP-Kollektive	78
Tabelle IV-M	Teil 3 Differentialblutbild der PEP-Kollektive	79
Tabelle IV-N	Verlauf MMP bei PEP von Baseline bis 4-Wochen-Kontrolle	81
Tabelle IV-O	Vergleich MMP bei PEP zwischen 4-Wochen-Kontrolle und 3-Monats-Kontrolle	82
Tabelle IV-P	Verlauf Apoptoseraten bei PEP von Baseline bis 3-Monats-Kontrolle	84
Tabelle IV-Q	Verlauf MMP bei PEP Truvada [®] /Kaletra [®] von Baseline bis 4-Wochen-Kontrolle	86
Tabelle IV-R	Vergleich MMP bei PEP Truvada [®] /Kaletra [®] zwischen 4-Wochen-Kontrolle und 3-Monats-Kontrolle	87
Tabelle IV-S	Verlauf Prozent Zellen mit erniedrigtem MMP bei PEP Truvada [®] /Kaletra [®] von Baseline bis 4-Wochen-Kontrolle	87
Tabelle IV-T	Vergleich Prozent Zellen mit erniedrigtem MMP bei PEP Truvada [®] /Kaletra [®] zwischen 4-Wochen-Kontrolle und 3-Monats-Kontrolle	88
Tabelle IV-U	Verlauf Apoptoseraten bei PEP Truvada [®] /Kaletra [®] von Baseline bis 3-Monats-Kontrolle.....	89

I Einleitung

I.1 Mitochondriale Dysfunktion

Die Veränderung der mitochondrialen Funktion ist mit vielen und sehr verschiedenen klinischen Situationen assoziiert und daher ein häufiges Phänomen. Klinisch äußert sich die verminderte Energiebereitstellung häufig vordergründig in den Skelettmuskelzellen (Finsterer, 2011). Typische sogenannte Mitochondriopathien, also Erkrankungen, die durch genetisch bedingte Funktionseinschränkungen dieser Zellen hervorgerufen werden, sind z. B. MERRF und MELAS (Lorenzoni *et al.*, 2011, Connolly *et al.*). Zu den Auslösern mitochondrialer Dysfunktion gehören physiologische Vorgänge wie körperliches Training (Tuan *et al.*, 2008), aber auch pathologische Bedingungen wie das Vorliegen einer Sepsis (Adrie *et al.*, 2001). Beim M. Parkinson scheint die Funktion dieser Zellorganellen ebenfalls gestört zu sein (Finsterer, 2011). Die Volkskrankheit essentielle Hypertonie wird mit vermehrtem oxidativen Stress in PBMC in Verbindung gebracht (Giner *et al.*, 2004), was wiederum eine Folge mitochondrialer Dysfunktion darstellt. Auch verschiedene Medikamente, wie zum Beispiel Neuroleptika, können die Funktion der Mitochondrien verändern (Casademont *et al.*, 2007). Eine weitere klinische Bedeutung der mitochondrialen Dysfunktion ergibt sich daraus, dass sie als wichtiger Mechanismus für die Auslösung von Nebenwirkung bei der Therapie mit antiretroviralen Substanzen gilt. Sie wird mit der Lipodystrophie, einer Fettverteilungsstörung, die im Rahmen der HAART bei HIV-Infektion häufiger beobachtet wird, in Zusammenhang gebracht (Côté *et al.*, 2003, Walker *et al.*, 2002, Birkus *et al.*, 2002, Venhoff *et al.*, 2007, López *et al.*, 2006, Cherry *et al.*, 2005, Foli *et al.*, 2001, Caron *et al.*, 2008). Die Lipodystrophie bzw. Lipoatrophie wurde bisher vor allem als Nebenwirkung einiger NRTI angesehen, die im Rahmen der HAART eingesetzt werden, vor allem Stavudin, Didanosin, Zidovudin und Zalcitabin (Cossarizza *et al.*, 2003, McComsey *et al.*, 2005, Rabing Christensen *et al.*, 2004, Lichtenstein, 2005). Weitere typische, mit mitochondrialer Dysfunktion assoziierte Nebenwirkungen sind periphere Neuropathie, Pankreatitis, Hyperlactatämie, Lactazidose, Erhöhung der Creatinkinase (CK) und fulminantes Leberversagen (Fleischer *et al.*, 2004). Diese Nebenwirkungen treten ebenfalls vor allem beim Einsatz der NRTI Didanosin, Stavudin, Zalcitabin und

Zidovudin auf. Für diese Substanzen konnten auch direkte Hinweise für mitochondriale Dysfunktion in einigen Studien nachgewiesen werden (Foli *et al.*, 2001). Als weitere mögliche Auslöser mitochondrialer Dysfunktion gelten chronische Virusinfektionen wie die Virushepatitiden B und C (Takada *et al.*, 1999, Rahmani *et al.*, 2000, Shirakata & Koike, 2003, Lee & Molinaro, 2003, Piccoli *et al.*, 2006, Wang & Weinman, 2006, Okuda *et al.*, 2002, Hara *et al.*, 2006, Machida *et al.*, 2006) oder die HIV-Infektion (Casula *et al.*, 2005, Chiappini *et al.*, 2004, Cossarizza *et al.*, 1997, Sternfeld *et al.*, 2007).

Zunächst werden einige Informationen zu den Mitochondrien selbst erläutert. Anschließend erfolgt die Darstellung der Apoptose, die im Zusammenhang mit Veränderungen an den Mitochondrien gesehen wird.

I.2 Das Mitochondrium

I.2.1 Funktion

Mitochondrien sind Zellorganellen, die die Zellen mit Energie versorgen (Schwartz & Ashwell, 2001). Neben dieser Aufgabe sind sie aber auch an anderen Stoffwechselprozessen wie beispielsweise der Hämoglobinsynthese, der β -Oxidation von Fettsäuren und am Citratzyklus beteiligt (Tzagoloff, 1982). Darüber hinaus sind sie noch maßgeblich an der Auslösung der Apoptose, also des aktiv gesteuerten Zelltodes, über den intrinsischen Weg beteiligt (Wallace, 1999). Sie kommen in fast allen Körperzellen vor, nicht aber in Erythrozyten. Ihre Anzahl hängt vom jeweiligen Energiebedarf der Zelle ab.

I.2.2 Aufbau

Da Mitochondrien bewegliche Zellorganellen sind, sich teilen und miteinander verschmelzen können, ist ihre Gestalt sehr variabel. Sie besitzen zwei Membransysteme, eine Außen- und eine Innenmembran. Der Raum zwischen den beiden Membranen wird als Intermembranraum bezeichnet, das Innere des

Mitochondriums, was von der Innenmembran umschlossen wird, wird Matrixraum genannt (Tzagoloff, 1982).

In der Inneren Mitochondrienmembran verankert befinden sich die Enzyme der Atmungskette. Hier findet die Synthese des ATP mit Hilfe von Sauerstoff als Elektronenakzeptor und NADH/H^+ bzw. FADH_2 als Elektronendonoren statt. Angetrieben wird die ATP-Synthese durch einen Protonengradienten, der über der inneren Mitochondrienmembran anliegt. Er bildet das mitochondriale Membranpotential (MMP). Außerdem befinden sich noch weitere Kanalproteine in der inneren Membran, welche zum Beispiel unter anderem die ATP/ADP-Translokase bilden (Tzagoloff, 1982).

Die äußere Mitochondrienmembran besitzt Poren, die für Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von 10.000 Da durchlässig sind (Tzagoloff, 1982).

Die Mitochondrien besitzen ihr eigenes Genom, die mtDNA. Sie hat eine Größe von 16569 bp (Andersson *et al.*, 1998), besteht aus einem H-Strang und einem komplementären L-Strang, ist zirkulär und superspiralisiert. Hier sind neben einigen Untereinheiten der Atmungskettenproteine auch die rRNAs für den Aufbau von Ribosomen und die tRNAs für die Proteinsynthese (Translation) kodiert (Wallace, 1999). Von Komplex I werden sieben Untereinheiten, von Komplex III eine, von Komplex IV drei und von der ATP-Synthase zwei Untereinheiten mitochondrial codiert.

I.2.3 Die aerobe Energiegewinnung in der Atmungskette durch oxidative Phosphorylierung

Wie oben bereits beschrieben, funktionieren die Reduktionsäquivalente NADH/H^+ und FADH_2 , welche durch katabole Stoffwechselforgänge wie die Glykolyse, die β -Oxidation von Fettsäuren und den Citratzyklus reduziert werden und somit als Zwischenspeicher für die Wasserstoffatome dienen, als Elektronendonoren für die Atmungskette.

Die Komplexe der Atmungskette katalysieren eine Reihe von Redoxreaktionen, wobei am Ende Sauerstoff als Elektronenakzeptor fungiert und dabei zu Wasser reduziert wird.

Durch diese Redoxreaktionen wird Energie gewonnen, um den Protonengradienten über der inneren Mitochondrienmembran herzustellen und aufrecht zu erhalten. Das entstehende elektrische Potential beträgt ca. 200 mV, wobei das Innere der Mitochondrien negativ geladen ist. Der Protonengradient beträgt ungefähr 1 U (Sternfeld *et al.*, 2007, Cossarizza, 2003). Die Mitochondrien innerhalb einer Zelle können allerdings unterschiedlich hohe MMPs aufweisen (Smiley *et al.*, 1991). Durch die resultierende protonenmotorische Kraft wird die Energie für die Phosphorylierung von ADP (Adenosindiphosphat) zu ATP (Adenosintriphosphat) bereitgestellt. ATP ist der entscheidende chemische Energielieferant aller Zellen, mit Hilfe dessen die Synthese verschiedener Moleküle, aktive Transportvorgänge über Membranen und andere energieverbrauchende Prozesse ermöglicht werden. Zwischen den membranständigen Komplexen findet der Elektronentransport durch Ubichinon (auch Coenzym Q₁₀ genannt, zwischen Komplexen I und III) und Cytochrom c (zwischen Komplexen III und IV) statt (Molyneux *et al.*, 2008).

Durch den Komplex I, die NADH-Dehydrogenase, werden vier Protonen vom Matrixraum in den Intermembranraum gepumpt. Der Komplex II (Succinat-Dehydrogenase) liefert keinen Beitrag zum Aufbau des Protonengradienten, Komplex III (Cytochrom-c-Reduktase) transportiert zwei Protonen, Komplex IV (Cytochrom-c-Oxidase) dann nochmals vier Protonen durch den Elektronentransport von der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum (Tan *et al.*, 2004, Sterky & Larsson, 2008).

Die ATP-Synthase (manchmal auch als Komplex V bezeichnet) nutzt nun den Protonengradienten, um aus ADP und Phosphat ATP und Wasser zu erzeugen (Varela *et al.*, 2008). Dieses Enzym besitzt zentral einen Protonenkanal, durch den die Protonen entlang des Gradienten fließen können und dadurch Energie abgeben. Diese Energie wird zuerst in mechanische Energie umgewandelt, in dem es zur Drehbewegung eines Segments des Enzyms kommt. Diese Drehbewegung wiederum ist die Antriebskraft für die ATP-Synthese, so dass die Energie von mechanischer letztendlich in chemische umgewandelt wird.

Die Rolle des MMP während der Apoptose ist noch nicht komplett verstanden. Bekannt ist, dass für den Vorgang der Apoptose ATP benötigt wird und für die

aerobe ATP-Gewinnung die Aufrechterhaltung des MMP von entscheidender Bedeutung ist. Die Verminderung des MMP auf Grund erhöhter Membrandurchlässigkeit der Mitochondrien durch Öffnung des mitochondrial permeability transition pore (mtPTP) (Green & Reed, 2008, Green & Kroemer, 2004) wird als wichtiges charakteristisches Merkmal der Apoptose angesehen (Chowdhury *et al.*, 2008). Im Zusammenhang mit der erhöhten Membrandurchlässigkeit kommt es zu einer Verminderung des mitochondrialen Membranpotentials über der inneren Mitochondrienmembran (Green & Kroemer, 2004). Dabei muss es nicht unbedingt zu einer Freisetzung von Cytochrom c aus dem Intermembranraum kommen, so dass man denkt, dass nur die innere Membran durchlässiger werden muss, damit das MMP zusammenbricht. Kürzlich wurde gezeigt, dass eine Verminderung des MMP bzw. der mtPTP per se keine direkte Caspasenaktivierung bewirken, so dass es vermutlich auch zu einer Verminderung des MMP ohne die Auslösung der Apoptose kommen kann und umgekehrt der Zusammenbruch des MMP nicht die Hauptrolle bei der Apoptose zu spielen scheint. Es ist außerdem noch unklar, ob alle Mitochondrien einer Zelle gleichzeitig in ihrer Funktion verändert werden oder ob nur einige Mitochondrien verändert werden, um die Apoptose auszulösen (Lugli *et al.*, 2005). Hepatitis B- und Hepatitis C-Viren sollen wiederum Apoptose auslösen, die mit einer erhöhten Durchlässigkeit der äußeren Mitochondrienmembran assoziiert ist (Green & Kroemer, 2004).

I.2.4 Mechanismen der Entstehung einer mitochondrialen Dysfunktion durch NRTI

Der Mechanismus, wie vor allem NRTI zu mitochondrialer Dysfunktion führen, ist nicht vollständig verstanden. Die NRTI können in phosphorylierter Form mit Hilfe eines Deoxynucleotidtransportproteins die innere Mitochondrienmembran überwinden (Lewis *et al.*, 2003, Dolce *et al.*, 2001). Man weiß, dass NRTI in ihrer phosphorylierten Form nicht nur die Reverse Transkriptase hemmen, sondern auch die menschlichen DNA-Polymerasen β und γ . Die Inhibition der DNA-Polymerase β hat wahrscheinlich keine klinischen Konsequenzen (Cherry *et al.*, 2005), allerdings ist die DNA-Polymerase γ für die Replikation und die Reparaturprozesse der mtDNA verantwortlich, so dass davon auszugehen ist, dass deren Inhibition zur Depletion des mtDNA-Gehalts und zu einer höheren Anzahl an Mutationen führt, was wiederum

durch die verminderte Synthese von Membranproteinen der Atmungskette mit ursächlich für die beobachtete mitochondriale Dysfunktion durch Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials und der Energiegewinnung und deshalb wiederum für die Entstehung der damit assoziierten Nebenwirkungen zu sein scheint (Cherry *et al.*, 2005, Lewis *et al.*, 2003). Außerdem entstehen bei verminderter Energieproduktion mehr Sauerstoffradikale, welche wiederum Schäden an der mtDNA, der DNA-Polymerase γ (Graziewicz *et al.*, 2002), den mitochondrialen Membranlipiden und noch weiteren Proteinen verursachen (Wallace, 1999). Auch der Glutathiongehalt in den Zellen ist vermindert, so dass die Sauerstoffradikale nicht suffizient durch Reduktion unschädlich gemacht werden können (Choi *et al.*, 2000). Die für die Zellen resultierende Situation wird als oxidativer Stress bezeichnet (Day & Lewis, 2004, Betteridge, 2000). Nucleotidanaloga, die Veränderungen am Ribosering aufweisen wie zum Beispiel Stavudin, werden mit höherer Wahrscheinlichkeit von der DNA-Polymerase γ ausgewählt, so dass bei diesen Substanzen die mitochondriale Toxizität besonders hoch zu sein scheint (Matsuda *et al.*, 2001). Darüber hinaus verursachen NRTI vermutlich Mutationen der mtDNA und Zidovudin kann zudem die ADP/ATP-Translokase im Tiermodell hemmen (Lewis *et al.*, 2003).

I.2.5 Marker für mitochondriale Dysfunktion

Als Marker für die mitochondriale Dysfunktion können der mitochondriale DNA-Gehalt, das Verhältnis von mitochondrialer DNA zu nucleärer DNA ermittelt durch real time PCR, die Aktivitäten bzw. die Expression der verschiedenen Atmungskettenkomplexe, die Zellproliferation in Zellkulturen, die Lactatproduktion und die Messung des MMP herangezogen werden (Venhoff *et al.*, 2007, Caron *et al.*, 2008). Im klinischen Setting ist die Serum-Lactatkonzentration am intensivsten untersucht worden, allerdings ist der Nutzen dieses Parameters bei asymptomatischen Patienten für diesen Zweck strittig (Cherry *et al.*, 2005). Als sehr sensitiver Marker für die Messung des mitochondrialen Membranpotentials hat sich der kationische Farbstoff JC-1 erwiesen (siehe Abschnitt III.3.4.2). Weitere erhältliche Farbstoffe zur Ermittlung des MMP per FACS sind Rhodamine-123, DiOC₆(3) und MitoTracker Red CMXRos (Cossarizza, 2003). Diese werden in der Diskussion (Kapitel V.6.2) genauer besprochen. Außerdem kann man an isolierten Mitochondrien mittels TPP⁺-Elektrode das MMP bestimmen (Cossarizza, 2003).

I.3 Apoptose

Im Zusammenhang mit einer Verminderung des MMP und somit als möglicher Effekt mitochondrialer Dysfunktion wird die Apoptose der Zellen gesehen (Lugli *et al.*, 2005).

Proliferation und Elimination von Zellen sind sorgfältig ausbalanciert im adulten menschlichen Organismus mit dem Ziel, die Gesamtzahl an Zellen gleichzuhalten (Carson & Ribeiro, 1993). Auch anormal strukturierte und defekte Zellen müssen eliminiert werden (Carson & Ribeiro, 1993). Der Zelltod ist somit ein lebenswichtiger Mechanismus.

Bezüglich des Zelltodes unterscheidet man den traumatischen Zelltod, die so genannte Nekrose, und den aktiv regulierten, „programmierten“ Zelltod, der als Apoptose bezeichnet wird, wobei physiologisch zahlenmäßig die Apoptose überwiegt.

Verstärkt werden kann die Apoptose durch externe Faktoren wie zum Beispiel UV-Licht (Ying & Häcker, 2007, Wu *et al.*, 2008), ionisierende Strahlung (Wilkins *et al.*, 2002, Pouget & Mather, 2001), Zytostatika, Hormone (Sharma & Lichtenstein, 2008), Wachstumsfaktormangel, Hypoxie (Mayer *et al.*, 2008) und auch durch Virusinfektionen (Taya *et al.*, 2000).

I.3.1 Molekulare Mechanismen bei Apoptose

Man unterscheidet bei der Auslösung der Apoptose grundsätzlich zwischen einem intrinsischen und einem extrinsischen Weg.

Ein Induktor der Apoptose über den intrinsischen Weg ist p53, ein Tumorsuppressor. Für die Induktion der Apoptose induziert p53 die Expression des bax-Gens. Die Proteine Bax und Bak sitzen in der äußeren Mitochondrienmembran und regulieren zusammen mit Bcl-2 und Bcl-xL, ebenfalls Membranproteine der äußeren Mitochondrienmembran, die Freisetzung von Cytochrom c aus dem mitochondrialen Intermembranraum in das Cytosol, was durch eine gesteigerte Durchlässigkeit der Membran mit dem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials gekoppelt zu sein scheint (Schwartz & Ashwell, 2001, Deng *et al.*, 2008). Diese

Freisetzung erfolgt vermutlich durch einen spannungsunabhängigen Kanal in der äußeren Mitochondrienmembran, der bei Induktion der Apoptose gebildet wird (MAC, mitochondrial apoptosis-induced channel), wobei Bax an der Bildung des Kanals direkt beteiligt sein könnte (Dejean *et al.*, 2005). Bax und Bak wirken hierbei pro-apoptotisch, Bcl-2 und Bcl-xL anti-apoptotisch (Cartron *et al.*, 2008, Teles *et al.*, 2008). Die Balance dieser beiden Proteintypen entscheidet darüber, ob eine Zelle in Apoptose geht oder nicht. Wenn Cytochrom c durch ein Überwiegen des Bax-Proteins über MAC-Kanäle in das Cytosol gelangt, bildet es einen Komplex mit Apaf-1 (Apoptose-Proteasen aktivierender Faktor) (Dejean *et al.*, 2005, Chowdhury *et al.*, 2008). Dieser Komplex bindet zwei Moleküle Procaspase-9 (Caspase steht für Cysteinyl-Aspartyl-Proteasen, welche einen Cysteinylrest im aktiven Zentrum besitzen und die Substrate hinter Aspartylresten spalten), wodurch ein noch größerer Komplex entsteht. Dies führt zur Autoaktivierung von Procaspase-9 zur aktiven Caspase-9, welche wiederum so genannte Effektorcaspasen vor allem der Typen 2, 3 und 7 aktiviert (Liu *et al.*, 1996, Chowdhury *et al.*, 2008).

Die Effektorcaspasen spalten nun zum einen Strukturproteine wie Lamin und Aktin, die am Aufbau des Zytoskeletts und der Kernlamina beteiligt sind, zum anderen wird die Proteolyse von DNA-Reparatur- und Spleißenzymen die beispielsweise PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymerase) und U1-snRNP eingeleitet (Chowdhury *et al.*, 2008). Dadurch schrumpft die Zelle und zerfällt in die apoptotischen Körperchen und ihr gehen vitale Enzyme verloren. Auch regulatorische Enzyme des Zellzyklus werden proteolytisch abgebaut, wie beispielsweise das Rb-Protein, p21 und p27. Als vierten Angriffspunkt aktivieren die Effektorcaspasen noch die CAD (Caspasen-aktivierte DNase), was zur oben bereits erwähnten Fragmentierung der DNA führt. Des Weiteren wird die fokale Adhäsionskinase inaktiviert, was zur Auflösung der fokalen Adhäsionskomplexe und somit zum Herauslösen der Zellen aus dem Verband führt (Chowdhury *et al.*, 2008).

Ein früher Aspekt der Apoptose ist der Verlust der Membransymmetrie. Das aus den Mitochondrien freigesetzte Cytochrom c induziert an der Zellmembran die Translokation eines negativ geladenen Membranlipids namens Phosphatidylserin, welches in jeder Zelle vorkommt, sich aber normalerweise nur in der inneren Schicht des Membranbilayers befindet. Unterstützt wird dieser Prozess durch ein Enzym namens Scramblase, welches zur Familie der Flippasen gehört. An dieses nun nach außen exponierte Phosphatidylserin kann das extrazelluläre Matrixprotein Annexin V

binden, welches die apoptotischen Partikel dadurch für umliegende Phagozyten markiert. Diese räumen durch Phagozytose die Partikel ab und es bleiben keine Zellreste übrig. Zur Detektion apoptotischer Zellen mittels Durchflusszytometrie oder Fluoreszenzmikroskopie kann FITC-gelabeltes Annexin V verwendet werden (Koopman *et al.*, 1994).

Beim extrinsischen Weg zur Auslösung der Apoptose spielen vor allem die so genannten Fas-Rezeptoren (CD95) auf der Zellmembran eine Rolle, welche zur Familie der TNF-Rezeptoren (Tumor Nekrose Faktor) gehören (Gloire *et al.*, 2008). Nach Bindung eines entsprechenden Fas-Liganden (Fas-L) kommt es zur Oligomerisierung des Rezeptors, was intrazellulär zur Aktivierung so genannter death domains (DD-Typ) führt, die cytosolischer Teil des Rezeptors sind. Daraufhin bilden die aktivierten death domains im Cytosol zusammen mit Adapterproteinen vom FADD-Typ (Fas-assoziierte DD-Proteine) einen Komplex. Die FADD-Proteine besitzen Domänen namens death effector domains (DED). An diese death effector domains der FADD-Proteine binden anschließend zwei Moleküle Procaspase-8 und werden somit aktiviert. Die Caspase-8 aktiviert nun wiederum die oben erwähnten Effektorcaspasen, was zu den oben beschriebenen Effekten und somit zur Apoptose der Zelle führt (Gloire *et al.*, 2008).

Ein anderer extrinsischer Weg läuft über den TNF-Rezeptortyp R1, der als Adapterprotein das so genannte TRADD (TNF-R1-associated protein with death domains) bindet und somit die Caspasen-Kaskade auslöst.

Über den genannten Weg durch den Fas-Rezeptor funktioniert die Auslösung der Apoptose von virusinfizierten Zellen und Tumorzellen durch zytotoxische CD8 + T-Lymphozyten (Telcian *et al.*, 2011).

I.4 Hepatitis B

Die Hepatitis B-Infektion wird als ein möglicher Auslöser von mitochondrialer Dysfunktion angesehen (Takada *et al.*, 1999, Rahmani *et al.*, 2000, Shirakata & Koike, 2003, Lee & Molinaro, 2003).

I.4.1 Epidemiologie, Verlauf der Infektion und Diagnostik

Die Hepatitis B ist eine der häufigsten Infektionskrankheiten mit rund 2 Milliarden Menschen weltweit, die eine Infektion durchgemacht haben und ungefähr 420 Millionen chronisch Infizierten (RKI, Stand 2004). Pro Jahr sterben etwa eine Million Menschen an den Folgen der Leberschädigung. In Deutschland sind ungefähr 7 % aller Personen anti-HBc positiv, was auf eine durchgemachte Infektion hinweist (RKI, 2010b). Hochprävalenzgebiete, in denen die Prävalenz bei 10 bis 20% liegt, sind Südostasien, China und Afrika südlich der Sahara (Wang & Jia, 2011, Valente *et al.*, 2010).

Seit Anfang der 80er Jahre ist ein Impfstoff auf dem Markt und die Inzidenz ist in Deutschland im Jahr 2009 zurückgegangen (RKI, 2010b). Seit 1995 wird zur Prävention die Impfung aller Säuglinge und Kleinkinder empfohlen, dazuhin die Komplettierung der Grundimmunisierung im Jugendalter, falls dies nicht als Kind erfolgte (RKI, 2010a). Außerdem gibt es die so genannten Indikationsimpfungen, die die Impfung aller gefährdeten Personengruppen vorsieht wie zum Beispiel alle Beschäftigten im Gesundheitswesen, i.v. Drogenabhängige, homosexuelle Männer, Empfänger von Erythrozytenkonzentraten, HIV-Infizierte, Personen mit chronischen Lebererkrankungen und Dialysepatienten (Mast *et al.*, 2005). Jedoch gibt es auch so genannte Immune escape-Mutanten (Pre-S/S-Gen-Mutanten), wodurch das Virus nicht mehr durch anti-HBs-Antikörper erkannt werden kann. Somit ist gegen diese Mutanten kein Impfschutz gegeben (Sayiner *et al.*, 2007, Carman *et al.*, 1990). Außerdem dürfen HBsAg-positive Personen kein Blut, keine Organe und kein Sperma spenden (Lok & McMahon, 2007).

Die Zeit bis zur Manifestation kann 40 bis 200 Tage betragen, abhängig von der Erregerdosis. Die Symptomatik ist abhängig von der Immunabwehr des Patienten, weshalb man verschiedene Verlaufsformen unterscheiden kann.

Akut kommt es bei ca. einem Drittel der Patienten zu einer ikterischen Hepatitis, ein weiteres Drittel bekommt eine anikterisch verlaufende Erkrankung und der Rest der Patienten zeigt gar keine Symptome. Ein fulminanter Verlauf der Hepatitis B ist sehr selten. Mehr als 90 % der akuten Infektionen bei Erwachsenen heilen aus (Yim & Lok, 2006), 5 bis 10% werden chronisch, vor allem Asymptomatische. Wenn die Hepatitis B vollständig ausheilt, sind Anti-HBe und Anti-HBs nachweisbar, während

HBeAg und HBsAg negativ werden (Serokonversion) (Ganem & Prince, 2004, Thomas, 2007).

Von einer chronischen Verlaufsform spricht man, wenn das HBsAg länger als 6 Monate nachweisbar ist (Thomas, 2007). Im Rahmen der chronischen Verlaufsform können als Folge der lange anhaltenden Entzündung eine Leberfibrose, Leberzirrhose (nach 5 Jahren Follow-up bei 15-20% der Patienten (Sung *et al.*, 2008)) und in seltenen Fällen sogar ein hepatozelluläres Carcinom (HCC, Wahrscheinlichkeit 200 mal höher als bei der Normalbevölkerung, (Sung *et al.*, 2008)) entstehen (Kao & Chen, 2005), wobei die Wahrscheinlichkeit für deren Auftreten bei Patienten mit positivem HBe-Antigen und mit einer Viruslast über 10.000 Kopien/ml größer ist (Chen *et al.*, 2006). Auch durch den gewohnheitsmäßigen Konsum von Alkohol lässt sich das Risiko für ein HCC noch steigern (Ohnishi *et al.*, 1982).

Die Schädigung der Leber kommt vermutlich überwiegend durch die Immunabwehr des Wirtsorganismus zustande und nicht so sehr durch die Virusinfektion selbst. Vor allem die Lyse von infizierten Hepatozyten durch CD8 positive zytotoxische T-Lymphozyten scheint eine entscheidende Rolle zu spielen (Das & Maini, 2010).

Unterschiedliche Mutationen des Virus können einen Einfluss auf die Schwere der Leberschädigung haben, je nachdem, wie intensiv die Mutanten replizieren und wie stark immunogen die Virusepitope sind (Locarnini *et al.*, 2003).

Die Schädigung der Leber macht sich durch eine Erhöhung der Enzyme GOT, GPT, γ -GT und aP im Blut bemerkbar. Bei entsprechendem Verdacht auf eine Leberfibrose dient die Sonographie der Leber als Kontrollmöglichkeit (Zhang *et al.*, 2011). Gesichert werden kann die Diagnose einer Leberfibrose, Leberzirrhose oder eines Hepatozellulären Carcinoms durch die Leberbiopsie mit anschließender histologischer Beurteilung (Martinez *et al.*, 2011).

Für die Diagnosestellung ist neben einer eventuell bestehenden klinischen Symptomatik vor allem die Bestimmung verschiedener serologischer Marker von Bedeutung. Anhand des serologischen Ergebnisses kann eine bestehende Infektion, eine abgelaufene Infektion und der Impfstatus beziehungsweise die Immunität festgestellt werden. Bestimmt werden können HBs-Antigen und Anti-HBs-Antikörper,

HBcAg, Anti-HBc-IgM und Anti-HBc-IgG, HBeAg und Anti-HBe (Ganem & Prince, 2004, Thomas, 2007).

I.4.2 Erreger

Das Hepatitis B Virus gehört zur Familie der Hepadnaviren (Ganem & Prince, 2004). Wie dem Namen zu entnehmen ist, handelt es sich um ein DNA-Virus. Die DNA ist zirkulär, teilweise doppelsträngig und hat eine Länge von 3200 Basenpaaren (bp) (Lu *et al.*, 2008, Seeger & Mason, 2000). Es gibt vier teilweise überlappende open reading frames, welche die Hülle (pre-S/S), das Kapsid (precore/core), die Polymerase und X-Proteine codieren (Ganem, 1991). Es besitzt eine Hülle aus lipidhaltigem HBs-Antigen („s“ steht für „surface“) und hat einen Durchmesser von 42 nm (Dane *et al.*, 1970). Das Viruskapsid besteht aus dem HBc-Antigen („c“ steht für „core“). Im Elektronenmikroskop wird das ganze Viruspartikel als „Dane-Partikel“ bezeichnet.

I.4.3 Therapieindikationen

Die Indikation zur medikamentösen Therapie ist sowohl bei Patienten mit HBeAg-positiver, als auch bei HBeAg-negativer chronischer Hepatitis B gegeben, wenn eine progrediente Leberfibrose oder eine kompensierte Leberzirrhose in Kombination mit positivem HBV-DNA-Nachweis vorliegt beziehungsweise bei Patienten mit dekompenzierter Leberzirrhose und positivem Nachweis von HBV-DNA in der PCR, und zwar unabhängig von der ALT-Plasmakonzentration (Fung *et al.*, 2008, Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselerkrankungen, 2007). Des Weiteren wird eine Therapie empfohlen, wenn die HBV-DNA über 2.000 IU/ml (10.000 Kopien/ml) beträgt und die ALT (GPT) über dem Doppelten der Norm erhöht liegt beziehungsweise eine deutliche entzündliche Aktivität des Leberparenchyms nachweisbar ist (Keeffe, 2007, Lai & Yuen, 2007). Allerdings sollte man bei diesen Patienten unter Umständen erst einmal drei bis sechs Monate abwarten, ob es zu einer spontanen Serokonversion von HBeAg kommt.

Bei Patienten mit normaler ALT ist die Wahrscheinlichkeit für eine HBe-Serokonversion eher gering, weshalb in diesem Fall die Risiken einer Therapie wie

beispielsweise die Resistenzentwicklung, Nebenwirkungen und Therapiekosten gegen den Benefit abgewogen werden müssen.

Keine Therapieindikation besteht in der Regel bei Patienten mit niedriger (weniger als 10.000 Kopien/ml) oder nicht nachweisbarer Viruslast, wiederholt normalen Transaminasen und nur minimaler entzündlicher oder fibrotischer Aktivität im Leberparenchym. In diesem Fall sollten Kontrollen der Transaminasen und HBV-DNA alle 3 Monate für das erste Jahr nach Diagnosestellung und anschließend alle 6 bis 12 Monate erfolgen, falls die GPT erhöht sein sollte alle 3 Monate (Ayoub & Keeffe, 2008).

I.4.4 Therapie

Die folgende Übersichtstabelle zeigt die derzeit in Deutschland zugelassenen Medikamente zur Behandlung der chronischen Hepatitis B, deren häufigsten Nebenwirkungen, Häufigkeit der Resistenzentwicklung und deren Wirksamkeit aus vergleichenden Studien.

Substanz-klasse	Wirkstoff	Handelsname	Standarddosierung	Nebenwirkungen	Wirksamkeit	Resistenzentwicklung
Virostatikum	Lamivudin	Zeffix®	100mg/d	Selten Pankreatitis, Lactazidose	++ ¹	+ ²³
Virostatikum	Adefovir	Hepsera®	10mg/d	Nephrotoxizität, Pharyngitis, Bronchitis, Husten, Schnupfen, Kopfschmerzen, Bauchschmerzen, Rückenschmerzen, Verdauungsstörungen ⁴	+ ⁵	++
Virostatikum	Tenofovir ⁶	Viread®	245mg/d	Fanconi-Syndrom	+++ ⁷	+++
Virostatikum	Entecavir	Baraclude®	0,5mg/d ⁸ , 1mg/d bei Lamivudin-resistenz ⁹¹⁰	Kopfschmerzen ¹¹ , Infektionen der oberen Atemwege, Pharyngitis, Husten, Müdigkeit, Übelkeit und Bauchschmerzen ¹²	+++ ¹³¹⁴¹⁵	+++ ¹⁶¹⁷¹⁸
Virostatikum	Telbivudin	Sebivo®	600mg/d		++ ¹⁹²⁰	+
Zytokin	Interferon α-2a	Roferon-A®	3x/Wo 2,5-5 Mio I.E./m ² KOF Bei HBeAg pos. über 16-32 Wochen, bei HBeAg neg. über 12 bis 24 Wochen	Fieber, Kopfschmerzen, Müdigkeit, Abgeschlagenheit, Myalgien, Arthralgien, Husten, Dyspnoe, Pharyngitis, Sinusitis, Thrombozytopenie, Neutropenie ²¹²² Übelkeit, Erbrechen, Durchfälle, Bauchschmerzen Gewichtsverlust, Haarausfall, Autoimmunphänomene, Konzentrationsstörungen, Depressionen	Bessere Erfolgsaussichten bei Genotypen A und B ²³²⁴ und bei HBeAg Positiven ²⁵	
Zytokin	Interferon α-2b	IntronA®	3x/Wo 5-10 Mio I.E.	s.o.		
Zytokin	Peginterferon α-2a	Pegasys®	1x/Wo 180 µg über 48 Wochen	s.o.		

Tabelle I-A In Deutschland zugelassene Medikamente zur Behandlung der chronischen Hepatitis B

-
- ¹ Dimou E et al. 2008
 - ² Lok ASF et al. 2003
 - ³ Suzuki F et al. 2008
 - ⁴ Hadziyannis SJ et al. 2006
 - ⁵ Hadziyannis SJ et al. 2006
 - ⁶ Marcellin P et al. 2007, Kao J et al. 2007
 - ⁷ Ayoub WS und Keeffe EB 2008
 - ⁸ Dimou E et al. 2007
 - ⁹ Inada M und Yokosuka O 2008
 - ¹⁰ Suzuki F et al. 2008
 - ¹¹ Gish RG et al. 2007
 - ¹² Suzuki F et al. 2008
 - ¹³ Hatakeyama T et al. 2007
 - ¹⁴ Gish RG et al. 2007
 - ¹⁵ Ayoub WS und Keeffe EB, 2008
 - ¹⁶ Tenney DJ et al. 2004
 - ¹⁷ Tenney DJ et al. 2007
 - ¹⁸ Kobashi H et al. 2007
 - ¹⁹ Chan HLY et al. 2007
 - ²⁰ Lai CL et al. 2005
 - ²¹ McHutchison JG et al. 1998
 - ²² Soza A et al. 2002
 - ²³ Janssen HL et al. 2005
 - ²⁴ Kao JH 2007
 - ²⁵ Niederau C et al. 1996

Die Therapiedauer mit Nucleotid- bzw. Nucleosidanaloga beträgt meistens vier bis fünf Jahre. Allerdings kann man im Gegensatz zu Interferon keinen definitiven Zeitrahmen festlegen und bei vielen Patienten ist das Therapieende erst einmal ungewiss, wobei die Serokonversion von HBeAg zu Anti-HBe als Endpunkt angesehen werden kann. Um die Rezidivrate zu senken, sollte die Therapie allerdings ungefähr 6 Monate nach Auftreten der Serokonversion weitergeführt werden (Lok & McMahon, 2007). Nach Beendigung der Therapie sollte man nach einem Monat und anschließend alle 3 Monate die HBV-DNA kontrollieren, um eine eventuelle Reaktivierung festzustellen und die Therapie gegebenenfalls wieder zu beginnen (Fung *et al.*, 2008). Bei HBeAg negativer Hepatitis B ist kein definitiver Endpunkt festgelegt, und auch bei Patienten, deren Viruslast nach einem Jahr Therapie unter der Nachweisgrenze liegt, kann es zu Rezidiven kommen. Daher ist in diesem Fall unklar, wann man die Therapie beenden kann, jedoch gilt das Absetzen der Therapie als unbedenklich, wenn die HBV-Replikation mindestens 4 bis 5 Jahre erfolgreich unterdrückt werden konnte (Papatheodoridis, 2011). Patienten mit kompensierter Leberzirrhose sollten allerdings lebenslang therapiert werden, um einem Leberversagen und einem HCC vorzubeugen, wobei diskutiert wird ob man die Therapie beenden kann, wenn der Patient kein HBsAg mehr aufweist.

Bei dekompensierter Leberzirrhose wird eine lebenslange Therapie in jedem Fall empfohlen. Interferon ist in diesem Fall kontraindiziert. Empfohlen wird die Therapie mit Lamivudin, bei Resistenzentwicklung gegen Lamivudin können Adefovir, Entecavir, Tenofovir oder Tenofovir plus Emtricitabin eingesetzt werden (Fontana, 2003, Liaw *et al.*, 2011). Entecavir und Tenofovir sollen am effektivsten sein (Papatheodoridis, 2011).

Interferon bietet gegenüber den anderen Therapieoptionen den Vorteil, dass ein definitives Therapieende festgelegt werden kann. Darüber hinaus können gegen Interferon keine Resistenzen entstehen und das Ansprechen auf die Therapie ist von längerer Dauer. Bei HBeAg positiven Patienten mit günstiger Voraussetzung für eine Serokonversion wird die Interferon-Therapie empfohlen. Bei einer HBV-Infektion mit den Genotyp A oder B besteht eine bessere Erfolgsaussicht als bei den anderen Genotypen, weshalb es bei der Erwägung einer Interferontherapie sinnvoll ist, den Genotyp zu bestimmen (Deterding *et al.*, 2008, Kao, 2007).

Außerdem sind die Kontraindikationen der Interferontherapie zu beachten. Hierzu gehören die dekompensierte Leberzirrhose, psychiatrische Erkrankungen, vor allem die Depression, Autoimmunerkrankungen, schwere KHK, COPD, Epilepsie, Leukopenie, Thrombopenie, Alkohol- und Drogenabusus, untherapierte Hyperthyreose, vorgesehene Organtransplantation und eine mangelhafte Compliance (Gane, 2011, Rote Liste®).

Interferon kommt vorwiegend bei jüngeren Patienten zur Anwendung, die keine Dauertherapie wünschen und bei denen die Entstehung von Resistenzen in Zukunft eine therapeutische Einschränkung zur Folge hätte.

I.4.5 Hepatitis B-Infektion und mitochondriale Dysfunktion

Im Rahmen der chronischen Hepatitis B wird postuliert, dass die mitochondriale Schädigung in Hepatozyten vorwiegend durch das X-Protein (HBx) hervorgerufen wird und zum Zelltod zum Beispiel in HuH-7 und HepG2 Zellkulturen führt. HBx scheint zu einer Dysfunktion des mtPTP (mitochondrialer Permeabilitätskomplex) zu führen, was zu einem Verlust des MMP führt und somit zum Mitochondrien-assoziierten Zelltod (Takada *et al.*, 1999, Rahmani *et al.*, 2000, Shirakata & Koike, 2003, Lee & Molinaro, 2003).

I.5 Hepatitis C

Auch bei der Hepatitis C-Infektion konnten bei *in vitro* infizierten Zellen Effekte mitochondrialer Dysfunktion beobachtet werden (Piccoli *et al.*, 2006, Wang & Weinman, 2006, Okuda *et al.*, 2002, Hara *et al.*, 2006, Machida *et al.*, 2006).

I.5.1 Epidemiologie und Verlauf der Infektion

Die Hepatitis C Infektion tritt weltweit auf mit ungefähr 170 Millionen chronisch Infizierten (WHO-Angabe 2004). Die Risikogruppen sind im Grunde die gleichen, wie bei der Hepatitis B Infektion, also vor allem i.v. Drogenabhängige, Dialysepatienten, Strafgefangene, medizinisches Personal und darüber hinaus Personen, die

Bluttransfusionen erhalten haben, bevor Blutprodukte bezüglich Hepatitis C getestet wurden (Williams *et al.*, 2011, Teutsch *et al.*, 2010, Ydreborg *et al.*, 2011, Weclawiak *et al.*, 2010). In Deutschland sind ungefähr 275000 Personen infiziert (RKI Stand 1998). Das Problem bei der Fallzahlschätzung der Hepatitis C liegt darin, dass die Infektion häufig unbemerkt abläuft und somit der Trägerstatus oft unbekannt ist.

Die durch chronische Hepatitis C hervorgerufene Leberzirrhose ist in den USA die häufigste Indikation zur Lebertransplantation (Gonzalez, 2010). Außerdem entstehen in den USA rund ein Drittel aller HCC auf Grund einer Leberzirrhose auf dem Boden einer chronischen Hepatitis C (Sanyal *et al.*, 2010).

Nach einer Inkubationszeit von ca. 2 bis 24 Wochen kommt es bei nur etwa 15% der Patienten zu einer akuten Hepatitis mit erhöhten Leberenzymen bis zum 10fachen der Norm. Die große Mehrheit der Patienten bemerkt gar keine oder nur unspezifische, meist milde, grippeähnliche Symptome. Weniger als ein Viertel der Patienten bekommen einen Ikterus. Diese Patienten haben eine höhere Wahrscheinlichkeit für eine Ausheilung der Erkrankung als asymptomatische Patienten. Andere Symptome können allgemeines Krankheitsgefühl, Übelkeit und unspezifische Schmerzen im rechten oberen Quadranten des Abdomens sein. Die akute Erkrankung hält typischerweise für 2 bis 12 Wochen an. Ein fulminanter Verlauf der akuten Hepatitis C ist sehr selten (Maheshwari *et al.*, 2008).

In mehr als 70% der Fälle kommt es zu einer Chronifizierung der Infektion (vor allem, wenn die akute Infektion asymptomatisch verlief), welche durch den Virusnachweis (HCV-RNA) über mehr als 6 Monate definiert ist (Mathurin *et al.*, 1998). Ca. 60 bis 80% weisen eine ständige Erhöhung der ALT auf. Mit der Chronifizierung besteht das Risiko, eine Leberzirrhose (in 20 bis 30% der Fälle nach 20 bis 30 Jahren Krankheitsverlauf) und später auch ein hepatozelluläres Carcinom (HCC, bis zu 3% Risiko pro Jahr) zu entwickeln (Bonis *et al.*, 1999, Scheuer *et al.*, 1992). Der Anti-HCV-Titer korreliert mit der Viruslast und diese korreliert wiederum mit der Schwere der Leberbeteiligung (Shindo *et al.*, 1995, Prieto *et al.*, 1995). Patienten, die in der Leberbiopsie entzündliche Veränderungen aufweisen, zeigen in der Regel auch erhöhte Transaminasen (Shindo *et al.*, 1995). Die chronische Infektion läuft in den meisten Fällen asymptomatisch ab oder die Patienten empfinden auf Dauer nur unspezifische Symptome wie vor allem Müdigkeit, verminderte Leistungsfähigkeit, Abgeschlagenheit, Oberbauchbeschwerden,

Übelkeit, Ikterus, Gewichtsverlust, Myalgien und Arthralgien, allerdings meistens in einer milden Form (Marcellin *et al.*, 1997).

Extrahepatische Manifestationen, die im Rahmen der chronischen Hepatitis C auftreten können, umfassen Autoimmunphänomene wie Arthritis, idiopathische thrombozytopenische Purpura (Liebman & Stasi, 2007) oder Thyreoiditis, hämatologische Erkrankungen wie sekundäre kryoglobulinämische Vaskulitis (Cacoub & Saadoun, 2008), Lymphome (vor allem B-Zell non-Hodgkin-Lymphome) und monoklonale Gammopathien (Giordano *et al.*, 2007, Silvestri *et al.*, 1996, Kawamura *et al.*, 2007), renale Beteiligung in Form von membranoproliferativer Glomerulonephritis, dermatologische Erkrankungen wie Lichen planus oder Porphyria cutanea tarda und Diabetes mellitus Typ II (Mehta *et al.*, 2003, El-Serag *et al.*, 2002, Mason *et al.*, 1999). Eine weitere Erkrankung, die mit der Hepatitis C Infektion assoziiert zu sein scheint, ist die Myasthenia Gravis (Setijoso *et al.*, 1999). Die extrahepatischen Manifestationen werden anscheinend überwiegend durch das Virus direkt verursacht. In einer Studie an 321 Patienten wiesen 38% mindestens eine extrahepatische Manifestation auf (Cacoub *et al.*, 2000).

I.5.2 Erreger

Das Hepatitis C Virus gehört zur Familie der Flaviviridae (Dustin & Rice, 2007) und ist ein umhülltes RNA-Virus. Es konnte erst im Jahr 1989 identifiziert werden (Choo *et al.*, 1989). Die RNA ist ein Positivstrang mit ca. 9500 bp. Codiert wird ein Polyprotein mit einer Größe von ungefähr 3000 Aminosäuren, welches durch posttranslationelle Prozessierung in Strukturproteine, nicht-Strukturproteine und Enzyme gespalten wird. Zu den Strukturproteinen gehört das Core-Protein (p21) und die Glycoproteine E1 (gp31) und E2 (gp70), welche die Hüllproteine darstellen. Die nicht-Strukturproteine werden mit NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B bezeichnet. Bei ihnen handelt es sich um Proteasen (NS2), NTPasen, RNA-Helicasen (NS3), Protease-Cofaktoren (NS4A) und bei NS5B handelt es sich vermutlich um die RNA-abhängige RNA-Polymerase des Virus. Die Funktionen von NS4B (evtl. Membranveränderungen) und NS5A (ein Phosphoprotein) konnten bisher nicht gesichert werden (Major & Feinstone, 1997).

Das Virus kann in bisher sechs verschiedene mit Zahlen bezeichnete Genotypen und diese wiederum in mehr als fünfzig verschiedene durch Buchstaben gekennzeichnete Subtypen eingeteilt werden (Simmonds *et al.*, 2005). Die Genotypen weisen höchstens 80% Sequenzhomologie auf und kommen regional unterschiedlich häufig vor, wobei in Deutschland und USA der Genotyp 1 am häufigsten vorkommt (60 – 70 % der Fälle). Der Genotyp spielt eine wichtige Rolle bezüglich des Therapieerfolgs, wobei die Genotypen 2 und 3 besser auf eine antivirale Therapie ansprechen als die Genotypen 1 und 4 (Davis & Lau, 1997).

I.5.3 Diagnostik

Die Diagnostik besteht vor allem im serologischen Nachweis von Anti-HCV-Antikörpern per EIA (Enzym-Immunoassay) (Lok & Gunaratnam, 1997, Gretch, 1997) als Screeningmethode und bei Patienten mit klinischen beziehungsweise laborchemischen Anzeichen einer Lebererkrankung im Anschluss bei positivem Anti-HCV-Ergebnis dem Nachweis von HCV-RNA im Blut mittels PCR (Strader *et al.*, 2004, Martinot-Peignoux *et al.*, 2000).

Die Beteiligung der Leber ist durch die labordiagnostische Ermittlung der Leberenzyme, durch sonographische Darstellung der Leber und gegebenenfalls durch Biopsien möglich (Bedossa *et al.*, 2003, Lok & Gunaratnam, 1997). Rund ein Drittel der Patienten weist dabei normale Serumwerte für die Transaminasen auf, bei den meisten sind die Leberenzyme nur leicht erhöht und ein Viertel hat eine ALT über dem Doppelten der Norm.

I.5.4 Therapie

Eine Therapie der Hepatitis C sollte erfolgen, sofern keine Kontraindikationen vorliegen, da das Risiko des Fortschreitens hin zu einer Leberzirrhose und eines HCC vermindert werden kann (Huang *et al.*, 2011). Die Indikation für eine Therapie bei chronischer Infektion ist bei positivem Nachweis von HCV-Antikörpern und dem Nachweis von HCV-RNA gegeben. An Medikamenten gegen die Hepatitis C stehen aktuell pegylierte Interferon α -Präparate und das Nucleosidanalogon Ribavirin zur Verfügung (Huang *et*

al., 2011). Die folgende Tabelle zeigt eine Übersicht über die Dosierung, die wichtigsten Nebenwirkungen und Kontraindikationen von Ribavirin und den verschiedenen Interferonen.

Substanzklasse	Wirkstoff	Handelsname	Dosierung	Nebenwirkungen	KI
Nucleosidanalogen	Ribavirin	Rebetol®	Genotyp 1: 800mg/d bei <65 kg, 1000mg/d bei 65 – 85 kg, 1200mg/d bei 86 – 105 kg und 1400mg/d bei >105 kg Genotypen 2 und 3: 800mg/d ¹ , zusätzliche Dosisanpassung bei Niereninsuffizienz	hämolytische Anämie ² , Müdigkeit, Depressionen, Schlaflosigkeit, Schwindel, Migräne ³ , Übelkeit, Hautausschlag, Hauttrockenheit Juckreiz ⁴	Schwangerschaft, die Verweigerung der sicheren Verhütung bei Frauen im gebärfähigen Alter, akutes bzw. chronisches Nierenversagen mit Dialysepflicht
Zytokine	Peginterferon α-2a	Pegasys®	1x/Wo 180 µg Genotypen 2 und 3: 24 Wochen Therapie Genotypen 1, 4 und 5: 48 Wochen Therapie	Fieber, Kopfschmerzen, Müdigkeit, Abgeschlagenheit, Myalgien, Arthralgien, Husten, Dyspnoe, Pharyngitis, Sinusitis, Thrombozytopenie,	dekompensierte Leberzirrhose, psychiatrische Erkrankungen, vor allem die Depression, Autoimmunerkrankungen, schwere KHK, COPD, Epilepsie, Leukopenie,
Zytokin	Peginterferon α-2b	PegIntron®	1,5 µg/kg KG/Wo	Neutropenie, Übelkeit, Erbrechen, Durchfälle, Bauchschmerzen Gewichtsverlust, Haarausfall, Autoimmunphänomene, Konzentrationsstörungen, Depressionen	Thrombopenie, Alkohol- und Drogenabusus, untherapierte Hyperthyreose, vorgesehene Organtransplantation, mangelhafte Compliance.

Tabelle I-B In Deutschland zugelassene Medikamente zur Behandlung der chronischen Hepatitis C

¹ Martin P und Jensen DM 2008

² De Franceschi L et al. 2000

³ Bräu N et al. 2003

⁴ McHutchison JG et al. 1998

Interferon muss in der pegylierten Form (Verbindung mit Polyethylenglycol) auf Grund einer längeren Halbwertszeit nur einmal wöchentlich subcutan im Bereich des Abdomens oder des Oberschenkels verabreicht werden. Die längere Halbwertszeit lässt sich durch eine geringere Resorptionsrate nach s.c.-Injektion und durch eine langsamere renale Clearance erklären. Darüber hinaus konnten in kontrollierten klinischen Studien höhere steady-state Plasmakonzentrationen erreicht werden. Außerdem konnten sowohl mit Peg-IFN-Monotherapie in einem Vergleich gegen Standard-Interferon Monotherapie als auch jeweils in Kombination mit Ribavirin höhere virologische Ansprechraten erzielt werden, und auch die Leberbiopsie zeigt bessere Ergebnisse, weshalb die pegylierte Form bevorzugt eingesetzt wird (Fried *et al.*, 2002).

Es sind derzeit zwei verschiedene pegylierte Interferon- α Präparate auf dem Markt, und zwar Peg-IFN α -2a (Pegasys®) und Peg-IFN α -2b (PegIntron®). Der Unterschied besteht in der Pharmakokinetik, wobei bisher keine Unterschiede bezüglich der Ansprechraten festgestellt werden konnten. Eine vergleichende prospektive randomisierte Studie (Laguno *et al.*, 2009) zeigte eine vergleichbare Wirksamkeit und Sicherheit beider Interferone.

Ribavirin ist chemisch gesehen 1- β -D-ribofuranosyl-1H-1,2,4-triazol-3-carboxamid, ein Nucleosidanalogen. Die Wirkmechanismen von Ribavirin sind noch nicht vollständig verstanden. Einige Untersuchungen haben belegt, dass die virale RNA-Polymerase gehemmt wird, dass Mutationen in der viralen RNA induziert werden und die Inosinmonophosphatdehydrogenase gehemmt wird (Martin & Jensen, 2008).

Eine Monotherapie mit Ribavirin bei chronischer Hepatitis C wird wegen Wiederanstieg der Viruslast nach Absetzen und ausbleibender Besserung der Inflammation der Leber nicht empfohlen (Martin & Jensen, 2008).

In Kombination mit Interferon- α zeigte sich aber eine Verbesserung bezüglich der Senkung der Viruslast gegenüber Interferon alleine, zusätzlich waren die Ansprechraten (SVR, d.h. 6 Monate nach Therapieende HCV-RNA negativ im Blut) wesentlich höher und die Rate an Nebenwirkungen und Therapieabbruchern war gleich wie bei der Interferon-Monotherapie, so dass die Kombinationstherapie aus pegyliertem Interferon- α und Ribavirin zur Zeit den Goldstandard in der Therapie der chronischen Hepatitis C darstellt (Huang *et al.*, 2011).

Die dauerhafte Heilungschance (SVR) liegt mit diesen Regimen bei 50 % für den Genotyp 1 und bei 65 bis 80 % für die Genotypen 2 und 3 (Fried *et al.*, 2002). Die Prognose wird vor allem durch das Vorhandensein einer Leberzirrhose bestimmt. Mit kompensierter Zirrhose betrug die 5-Jahres-Überlebensrate 91%, bei Patienten mit dekomensierter Leberzirrhose hingegen lag die 5-Jahres-Überlebensrate bei 50% (Vezali *et al.*, 2010, Iacobellis *et al.*, 2008).

I.5.5 Hepatitis C-Infektion und mitochondriale Dysfunktion

Auch bei der chronischen Hepatitis C-Infektion ist bekannt, dass Veränderungen am MMP sowohl in Hepatozyten als auch in PBMC auftreten. Diese Untersuchungen wurden allerdings an Zellkulturen (z. B. HepG2, HuH-7 und HeLa), also *ex-vivo*, durchgeführt. Auf Grund der Ergebnisse dieser Experimente geht man davon aus, dass die mitochondriale Schädigung und oxidativer Stress im Rahmen der Hepatitis C-Infektion durch die viralen Proteine Core und NS5a verursacht werden (Piccoli *et al.*, 2006, Wang & Weinman, 2006, Okuda *et al.*, 2002, Hara *et al.*, 2006, Machida *et al.*, 2006). Zur Erforschung der pathophysiologischen Mechanismen dieser mitochondrialen Schädigung wurden Versuche an isolierten Mitochondrien von HCV-transgenen Mäusen und an Zellen, die das gesamte HCV-Genom enthielten, durchgeführt. Das Core Protein bindet an das ER und die Mitochondrien. Die Bindung an die Mitochondrien soll zu einer gesteigerten Ca^{2+} Aufnahme führen und dadurch zu einer Steigerung der Superoxidproduktion, zur Oxidation der Glutathions und zur Inhibition der Komplex I-Aktivität. Auch NS5a induziert durch das ER über einen durch Calcium-Ionen vermittelten Mechanismus eine gesteigerte ROS-Produktion durch die Mitochondrien. Der resultierende oxidative Stress in den Hepatozyten wird für die Entstehung der Leberfibrose und Leberzirrhose verantwortlich gemacht. Alkohol soll die ROS-Produktion noch zusätzlich steigern und dadurch die Entstehung der Leberschädigung noch zusätzlich beschleunigen (Korenaga *et al.*, 2005). Bei transgenen Mäusen, die HCV-Proteine exprimierten, wurde eine 25%ige Verminderung der Komplex I-Elektrontransportkapazität festgestellt, allerdings keine Anomalitäten der Komplexe II, III und IV beobachtet. Im Zusammenhang mit der gesteigerten ROS-Produktion in den Hepatozyten wurde auch eine gesteigerte Apoptoserate dieser Zellen nachgewiesen. Außerdem führen die ROS zu DNA-Schäden. Diese Veränderungen

sind analog zu denen, die man bei der HBV-Infektion durch das Protein HBx beobachten konnte. In humanen Zellkulturen, die den gesamten HCV open reading frame (ORF) exprimierten, ging die Aktivität der Atmungskette um 40% zurück und bei Zugabe von Oligomycin ging der O₂-Verbrauch noch weiter zurück. Die HCV-infizierten Zellen hatten signifikant mehr hypopolarisierte Mitochondrien als nicht-infizierte Kontrollzellen, wobei auch eine größere funktionelle Heterogenität aufgefallen ist. Allerdings waren die Morphologie und die Anzahl der Mitochondrien pro Zelle bei Infizierten und Nicht-Infizierten gleich. Die Aktivität des Komplexes I der Atmungskette war gegenüber den Kontrollen signifikant niedriger wohingegen die Aktivitäten der Komplexe III und IV gegenüber den Kontrollen sogar leicht erhöht waren, allerdings statistisch nicht signifikant. Außerdem wurde beobachtet, dass durch die verminderte Komplex-I-Aktivität mehr ROS von den HCV-infizierten Zellen produziert wurden. Als Erklärung wird angegeben, dass die HCV-Proteine sich an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) anlagern und zu einer Verminderung des Ca²⁺-Gehalts im ER durch Freisetzung führen. Dieses Ca²⁺ akkumuliert in den Mitochondrien und führt somit zu einer Membrandepolarisation. Als Reaktion der Mitochondrien werden Dehydrogenasen aktiviert, was eine Anpassung an die energieverbrauchende Stresssituation darstellen soll. Diese Reaktion scheint über einen begrenzten Zeitraum sinnvoll zu sein, führt allerdings über längere Zeit zu einer zusätzlichen Schädigung (Piccoli *et al.*, 2006).

Diese entstehenden mitochondrialen Schäden und der oxidative Stress in Hepatozyten werden pathophysiologisch für die Entstehung der Leberfibrose, Leberzirrhose und letztendlich des hepatozellulären Carcinoms (HCC) mitverantwortlich gemacht, die bei einigen Patienten als Folge der chronischen Hepatitis zu beobachten sind (Diamond *et al.*, 2007, Piccoli *et al.*, 2006, Wang & Weinman, 2006, Okuda *et al.*, 2002, Hara *et al.*, 2006, Machida *et al.*, 2006). Des Weiteren wurde festgestellt, dass bei Hepatitis C - Patienten auf der Zelloberfläche der PBMC verstärkt das Protein Fas exprimiert wird. Zudem waren die Serumkonzentrationen von sFasL höher als bei einem Normalkollektiv, sodass man davon ausgehen muss, dass die Fas-vermittelte Apoptoserate der PBMC bei Hepatitis C-Patienten signifikant erhöht ist, was zusammen mit einer beobachteten Splenomegalie die verminderte Anzahl von PBMC bei diesen Patienten erklären würde (Taya *et al.*, 2000).

I.6 HIV-Postexpositionsprophylaxe

Die HIV-Postexpositionsprophylaxe (PEP) ist eine Möglichkeit, das Infektionsrisiko mittels Einnahme antiretroviraler Medikamente noch nach einem Ereignis, bei dem die Übertragung von HIV stattgefunden haben könnte, zu senken (Deutsch-Österreichische Empfehlungen, 2008).

Das HI-Virus kann durch Kontakt mit infektiösem Blut, Sperma, Vaginalsekret oder Virusulturen auf Wunden, geschädigter Haut, Schleimhäuten oder bei Augenkontakt übertragen werden (McWilliams & Blanshard, 1994). Die entsprechenden Situationen, in denen dies geschehen kann, sind Verletzungen mit kontaminierten Instrumenten, z.B. bei Krankenhauspersonal oder Laborpersonal, durch ungeschützten Geschlechtsverkehr mit infizierten Personen mit einem höheren Risiko bei Anal- oder Vaginalverkehr und einem eher geringen Risiko bei Oralverkehr, sehr selten durch Transfusion von kontaminiertem Blut und Blutprodukten (Allain *et al.*, 2009) oder häufiger durch gemeinsame Benutzung von Injektionsnadeln und Spritzen bei i.v.-Drogenabhängigen (Moore, 2011).

Das Risiko einer Übertragung in oben genannten Situationen liegt ohne Postexpositionsprophylaxe zwischen 1:100 und 1:1000 und ist abhängig von der übertragenen Erregermenge und der Expositionsdauer. Einen Ausnahmefall stellt die Transfusion von virämischem Blut dar, bei der die Übertragungswahrscheinlichkeit praktisch 100% beträgt (Katzenstein *et al.*, 2000). Bei perkutaner Exposition mit Blut einer infizierten Person geht man von einer Infektion bei 330 Fällen aus (CDC, 1996, Tokars *et al.*, 1993). Die Ansteckungsgefahr scheint deutlich geringer zu sein, wenn die Viruslast der Indexperson durch eine HAART unter die Nachweisgrenze supprimiert ist. Das Übertragungsrisiko kann durch möglichst schnelle Einleitung (ideal sofort, möglicher Nutzen innerhalb von 24 Stunden, maximal nach 48 Stunden (European AIDS Clinical Society, 2011)) einer temporären Gabe antiretroviraler Medikamente nach dem Ereignis für eine Dauer von 28 Tagen nochmals deutlich reduziert werden, heutzutage wahrscheinlich um mehr als 80% (Cardo *et al.*, 1997), jedoch ist eine Transmission auch mit einer Kombination mehrerer antiretroviraler Substanzen nicht sicher ausgeschlossen (Beltrami *et al.*, 2000, Tokars *et al.*, 1993, Looke & Grove, 1990). Bei unsicherer Indikation empfiehlt sich die Einleitung der PEP, da die

Medikamenteneinnahme nach anschließender erneuter Abklärung gegebenenfalls jederzeit abgebrochen werden kann.

I.6.1 Indikationen bei beruflicher Exposition

Bei perkutanen Verletzungen mit HIV-kontaminierten Injektionsnadeln für Blut, Liquor, Punktatmaterial, Organmaterial oder Viruskulturmateriel, sollte eine PEP empfohlen werden (European AIDS Clinical Society, 2011). Bei oberflächlichen Verletzungen oder Kontakt mit Schleimhäuten beziehungsweise verletzter Haut sollte man eine PEP anbieten und mit dem Patienten den Nutzen und das Risiko genau besprechen, bei bekannt hoher Viruslast des Indexpatienten allerdings ist die Durchführung einer PEP wiederum empfehlenswert.

Falls es nur zu einem Kontakt mit Urin oder Speichel gekommen sein sollte, ist eine PEP sowohl bei oberflächlichen Verletzungen als auch bei Nadelinokulation nicht empfehlenswert, ebenso wie bei Kontakt von selbst hochinfektiösem Material mit der intakten Haut (Deutsch-Österreichische Empfehlungen, 2008).

I.6.2 Indikationen bei nicht-beruflicher Exposition

Für den unwahrscheinlichen Fall, dass sich Blutkonserven nach Transfusion als potentiell infektiös herausstellen, sollte auf Grund des sehr hohen Übertragungsrisikos auch noch binnen 48 Stunden (European AIDS Clinical Society, 2011) bzw. 72 Stunden (Deutsch-Österreichische Empfehlungen, 2008) der Beginn einer PEP dringend empfohlen werden. Bei ungeschütztem vaginalem oder analem Geschlechtsverkehr (auch durch gerissenes Kondom) wird die Durchführung einer PEP empfohlen. Ebenfalls dringend empfehlenswert ist die PEP nach gemeinsamer Benutzung von Injektionsnadeln oder Spritzen bei i.v.-Drogenabhängigen. Bei Aufnahme von Sperma einer HIV-positiven Person in den Mund sollte eine PEP im Falle zusätzlich vorliegender Läsionen im Mundraum angeboten und mit dem Patient die Nutzen und Risiken ausführlich besprochen werden. Nach Transfusion einer kontaminierten Konserve ist die Einleitung einer PEP auch noch nach mehr als 72 Stunden gerechtfertigt (Katzenstein *et al.*, 2000, Deutsch-Österreichische Empfehlungen, 2008).

Bei allen sexuellen Kontakten ohne Kontakte mit Sperma oder Blut besteht keine Empfehlung für die Einleitung einer PEP. Ebenso stellt eine Nadelstichverletzung an einer herumliegenden Injektionsnadel keine PEP-Indikation dar. Nach einer Vergewaltigung ist im Allgemeinen ebenfalls keine PEP notwendig, kann aber bei Verdacht des Vorliegens einer HIV-Infektion beim Vergewaltiger angeboten werden.

Falls der HIV-Status der Indexperson unbekannt sein sollte, spielt es eine Rolle, zu welcher Personengruppe der Indexpatient gehört. Eine PEP ist nur dann indiziert, falls die HIV-Prävalenz dieser Personengruppe mehr als 10% beträgt.

Das sexuelle Übertragungsrisiko ist bei nicht beschnittenen Männern, bei Vorliegen eines Herpes genitalis, bei gleichzeitig vorliegenden bakteriell verursachten sexuell übertragbaren Erkrankungen, bei Vorliegen einer hohen Viruslast der infizierten Person oder im Stadium der akuten HIV-Infektion erhöht (Deutsch-Österreichische Empfehlungen, 2008).

I.6.3 Empfohlene Medikamente

Bei der Auswahl der Medikamente sind unter anderem die bei der Indexperson eingesetzten Medikamente und eventuell bekannte Resistenzen zu berücksichtigen.

Als Medikamente stehen grundsätzlich nucleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI), nicht-nucleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTI) und Proteaseinhibitoren (PI) zur Verfügung.

Als Standardkombinationen zur HIV-PEP gelten derzeit zwei NRTI plus ein geboosteter PI. Als NRTI werden die Kombinationen Emtricitabin/Tenofovir (Truvada® 200/300mg 1-0-0) oder Zidovudin/Lamivudin (Combivir® 2x/d 300/150mg) empfohlen. Truvada® bietet gegenüber Combivir® den Vorteil einer besseren Verträglichkeit und eines schnelleren Wirkungseintritts. Von den PI ist Kaletra® (Lopinavir 400mg/Ritonavir 100mg 2-0-2) zu bevorzugen, da es durch das enthaltene Ritonavir bereits geboostet ist und ein einfaches Einnahmeschema besitzt, so dass die Kombination aus Truvada® plus Kaletra® derzeit den Standard darstellt (European AIDS Clinical Society, 2011, 2008, Tosini *et al.*, 2010).

Abacavir (Ziagen®), Efavirenz (Sustiva®) und Nevirapine (Viramune®) sollten auf Grund von gelegentlich auftretenden schweren Nebenwirkungen (bei Abacavir Hypersensitivitätsreaktionen, bei Nevirapine fulminantes Leberversagen, bei Efavirenz ZNS-Nebenwirkungen wie Benommenheit, Albträume, Schwindel) zur Durchführung einer PEP eher nicht verwendet werden (2008).

Mögliche Nebenwirkungen bei Tenofovir sind CK-Erhöhung, Hypophosphatämie, Nephrotoxizität und Pankreatitis, bei Zidovudin treten gelegentlich Kopfschmerzen und Müdigkeit auf, Lopinavir/Ritonavir kann gastrointestinale Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen und Diarrhoen verursachen. Emtricitabin macht nur selten Nebenwirkungen. Auch Abgeschlagenheit, Blutbildveränderungen und Veränderungen der Leber- und Nierenparameter, der Triglycerid- und Cholesterinkonzentration und Hypophosphatämie können beobachtet werden. Des Weiteren kann eine bereits bestehende Insulinresistenz verstärkt werden. Die Nebenwirkungen sind in der Regel nach Absetzen der Medikamente reversibel (Tosini *et al.*, 2010).

I.7 Antivirale Therapie und mitochondriale Dysfunktion

I.7.1 Einfluss der NRTI auf die mitochondriale Funktion

Bei PEP wird heute primär der Einsatz der neueren NRTI Emtricitabin und Tenofovir empfohlen (European AIDS Clinical Society, 2011, 2008, Tosini *et al.*, 2010). Alternativ können die älteren NRTI Lamivudin und Zidovudin zum Einsatz kommen. Der Einfluss dieser Substanzen auf die Mitochondrien unterschiedlicher Zelltypen wurde in den folgenden Studien untersucht.

1.7.1.1 Untersuchungen an Zellkulturen

In vitro Untersuchungen an Zellkulturen (Hepatoblastomzellen HepG2, Skelettmuskelzellen SkMC, und renalen proximalen Tubuluszellen) zeigten, dass Tenofovir, Abacavir und Lamivudin alleine weder einen Einfluss auf den mitochondrialen DNA-Gehalt, noch auf die Expression von COX II und IV hatten, so dass für diese NRTI in dieser Arbeit keine mitochondriale Toxizität in vitro nachgewiesen werden konnte. Zalcitabin hat sich als mitochondrien-toxischstes NRTI herausgestellt, und auch bei Didanosin, Stavudin und Zidovudin wurden Veränderungen der mitochondrialen Parameter festgestellt (Birkus *et al.*, 2002).

In einer anderen Arbeit an HepG2 Hepatoblastomzellen zeigten Tenofovir und Lamivudin alleine keinerlei Veränderungen bezüglich Lactatproduktion, intrazellulärer Lipide, des mtDNA-Gehalts und der Expression der Cytochrom c Oxidase COX II-Untereinheit. Emtricitabin verminderte die Zellproliferation, zeigte allerdings keine Effekte bezüglich der anderen Parameter. Didanosin und Stavudin verursachten eine Verminderung des mtDNA-Gehalts, verminderte COX II-Expression, vermindertes Zellwachstum und erhöhte Lactat- und Lipidproduktion. Abacavir und Zidovudin verminderten zwar stark die Zellproliferation und erhöhten die Lactat- und Lipidkonzentrationen, aber sie induzierten keinerlei Veränderungen bezüglich des mtDNA-Gehalts. In Kombination konnten für Tenofovir + Lamivudin nur minimal toxische Wirkungen gezeigt werden, Tenofovir + Emtricitabin bremsten zwar das Zellwachstum, zeigten aber keine Veränderungen der mitochondrialen Funktionsparameter. Alle Kombinationen mit Didanosin, Stavudin, Zidovudin und Abacavir führten allerdings zu starken Beeinträchtigungen der mitochondrialen Funktion. Tenofovir und Lamivudin verminderten die mitochondrientoxischen Effekte von Didanosin, verstärkten aber die von Abacavir und Zidovudin (Venhoff *et al.*, 2007).

Mit der Einnahme von Tenofovir wurde im Lauf der Zeit bei einigen Patienten eine Verschlechterung der Nierenfunktion festgestellt (Saumoy *et al.*, 2004). Tenofovir alleine zeigte keinen Effekt auf die Viabilität von Tubuluszellen der Nieren, den mtDNA-Gehalt und den Gehalt an COX-II-mRNA. Allerdings wurde in Kombination mit Didanosin dessen Toxizität verstärkt beobachtet, was durch eine Hemmung der Didanosin-Clearance durch Tenofovir erklärt werden konnte. Zidovudin war weniger

toxisch als Didanosin, zeigte nur in sehr hohen Konzentrationen eine deutliche Verminderung der mtDNA und der COX-II-mRNA und die Toxizität wurde durch Tenofovir nicht verstärkt (Vidal *et al.*, 2006).

I.7.2 Einfluss der Medikamente und der Infektion gemeinsam auf die mitochondriale Funktion

I.7.2.1 Untersuchungen an Zellkulturen

Stavudin und Zidovudin führten in humanen Fibroblastenkulturen und in Fettgewebeproben von HIV-infizierten Patienten mit Lipodystrophie zu Veränderungen der Aktivität der COX-Untereinheiten II und IV, des mitochondrialen Membranpotentials, der mitochondrialen Masse und zur Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Auch die Zellproliferation, der Zellzyklusarrest, die Aktivität der β -Galactosidase und die Zellmorphologie wurden durch diese Substanzen negativ beeinflusst.

Abacavir, Didanosin, Lamivudin und Tenofovir hatten hingegen keinen Einfluss auf die untersuchten Parameter (Caron *et al.*, 2008).

I.7.2.2 Untersuchungen an Patienten

Durchflusszytometrisch untersucht wurden die Lymphozyten vertikal HIV-infizierter Kinder, die eine HAART (verschiedene Kombinationen aus Zidovudin, Didanosin, Stavudin, Lamivudin, Nelfinavir, Ritonavir, Indinavir) erhielten, einmal mit Lipodystrophie (n=6), einmal ohne Lipodystrophie (n=12) und gesunde Kontrollen (n=6). Bezüglich des mtDNA-Gehalts (durch PCR ermittelt) gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, das gleiche gilt für das mitochondriale Membranpotential (ermittelt durch den Farbstoff JC-1) und die Tendenz der Zellen, apoptotisch zu werden (ermittelt durch Annexin V-FITC und Propidiumiodid). Allerdings produzieren Kinder noch T-Lymphozyten im Thymus, was dazu führt, dass die Lymphozyten zum großen Teil der HAART noch nicht sehr lange exponiert waren, so dass unter Umständen noch keine relevanten Schäden an den Lymphozyten entstanden sind. Außerdem haben nicht aktivierte Lymphozyten eher eine niedrigere ATP-Produktion und wahrscheinlich

ein niedrigeres mitochondriales Membranpotential. Des Weiteren enthalten Lymphozyten nur ungefähr 15-20 Mitochondrien pro Zelle. Dies könnten Einflüsse sein, die unter Umständen zu diesen Ergebnissen beigetragen haben (Cossarizza *et al.*, 2002).

In einer weiteren Studie konnte ungewöhnlicherweise ein erhöhter mtDNA-Gehalt in PBMC bei 23 HIV-infizierten Patienten unter HAART mit Lipodystrophie im Vergleich zu 11 HIV-Infizierten ohne Lipodystrophie und 10 HIV-negativen Kontrollen nachgewiesen werden. Zwischen CD4- und CD8-Zellen konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich des mtDNA-Gehalts sowohl bei den Kontrollen als auch bei HIV-Positiven ohne Lipodystrophie festgestellt werden. Der mtDNA-Gehalt war bei Patienten mit Lipodystrophie gleich wie bei Patienten ohne Lipodystrophie, die Stavudin oder Zidovudin in ihrem HAART-Regime hatten. Erhöht war der mtDNA-Gehalt bei Patienten mit Fettakkumulation im Vergleich zu HIV-Infizierten und HIV-negativen Kontrollen (Cossarizza *et al.*, 2003).

In einer anderen Arbeit an 12 HIV-Infizierten mit HAART und mit Lipodystrophie (LD), 12 HIV-Positiven mit HAART ohne LD und 24 HIV-Positive ohne HAART wurden gegenteilige Ergebnisse gefunden. Die Patienten mit LD wiesen einen verminderten mtDNA-Gehalt und eine Reduktion der Aktivität der Komplexe III und IV gegenüber den Patienten ohne HAART auf. Komplex II zeigte eine normale Aktivität. Bei den Patienten mit HAART ohne LD waren die Veränderungen dieser Parameter statistisch nicht signifikant. Der spektrophotometrisch ermittelte Sauerstoffverbrauch unterschied sich bei allen Gruppen nicht. In dieser Arbeit wurden die CD4-positiven und CD8-positiven Zellen nicht sortiert (Miró *et al.*, 2003).

Durch Stavudin hervorgerufene mitochondriale Toxizität scheint reversibel zu sein, wenn man die Therapie entweder auf Abacavir oder Zidovudin umstellt. Bei der Untersuchung der Atmungskettenaktivität in Rhabdomyozyten und des mtDNA-Gehalts in PBMC, Rhabdomyozyten und Adipozyten an 16 Patienten zeigte sich, dass 48 Wochen nach der Umstellung der Therapie der mtDNA-Gehalt in allen drei Geweben zugenommen hatte. Auch die Fettverteilung im DXA-Scan (Dual X-Ray Absorption) hat sich 40 Wochen nach Umstellung der Therapie wieder verbessert und die Apoptoserate (TUNEL-Assay) der Adipozyten ist von 2% auf 1,25% zurückgegangen. Zudem hat die Aktivität des Komplexes I der Atmungskette wieder zugenommen, wohingegen die anderen Komplexe in ihrer Aktivität gleich geblieben sind beziehungsweise sich

verschlechtert haben, wenn auch nicht signifikant. Es wurde allerdings nicht herausgearbeitet, unter welchem neuen Therapieregime die größten Verbesserungen erzielt werden konnten (McComsey *et al.*, 2005). Auch durch eine Umstellung von Stavudin/Didanosin auf Tenofovir/Lamivudin können Lipoatrophie gebessert, der Quotient mtDNA/nDNA wieder gesteigert und die Konzentration der Serumlipide und des Lactats gesenkt werden (Ananworanich *et al.*, 2008).

López S *et al.* untersuchten die mitochondriale Toxizität der Kombination aus Didanosin und Tenofovir zur Baseline, nach 6 und 12 Monaten im Verlauf in PBMC. Verglichen wurden zwei Kollektive mit jeweils 22 Patienten, wobei die eine Gruppe ein Didanosin-basiertes HAART-Regime erhielt und die andere Gruppe auf eine Kombination aus Didanosin plus Tenofovir und Nevirapine wechselte. In beiden Gruppe zeigte sich eine Verminderung des mtDNA-Gehalts, der mitochondrialen Masse und der COX-Aktivität über die Zeit, allerdings war der Unterschied nur in der Gruppe statistisch signifikant, welche die Kombination aus Didanosin und Tenofovir erhielt, so dass man von einer Verstärkung der toxischen Wirkung in dieser Kombination ausgehen muss (López *et al.*, 2006).

Somit scheinen zusammenfassend Stavudin, Zidovudin und Didanosin die Funktion der Mitochondrien stärker zu beeinflussen als Tenofovir, Emtricitabin, Abacavir und Lamivudin.

I.7.3 Einfluss von Proteaseinhibitoren auf die mitochondriale Funktion

Eine Arbeitsgruppe untersuchte bei 20 nicht HIV-infizierten Kontrollpersonen, 16 HIV-infizierten Therapienaiven und 17 HIV-infizierten Patienten, die Nelfinavir in Kombination mit Zidovudin und Lamivudin (als Kombination unter dem Namen Combivir® erhältlich) oder Didanosin und Stavudin in ihrer HAART seit mindestens 12 Monaten als First-Line-Therapie erhielten, die Effekte des Proteaseinhibitors auf die mitochondrial ausgelöste Apoptose von PBMC. Die HIV-Infizierten wiesen weniger mtDNA in den PBMC auf als die HIV-Negativen. Der Quotient aus Caspase-9/Bcl-2 war bei den HIV-Infizierten signifikant höher als bei den nicht infizierten Kontrollen. Bei den therapierten Patienten die Nelfinavir erhielten, war der Quotient besser als bei den

Therapienaiven. Der mtDNA-Gehalt war bei den Patienten, die Nelfinavir mit Zidovudin und Lamivudin erhielten wie bei den Therapienaiven, wohingegen er bei den Patienten, die Nelfinavir in Kombination mit Didanosin und Stavudin erhielten, noch weiter vermindert war. Allerdings zeigten sich keine Unterschiede hinsichtlich der Apoptoseraten zwischen diesen beiden therapierten Untergruppen. Als Schlussfolgerung führten die Autoren an, dass Nelfinavir einige der mitochondrientoxischen Effekte der NRTI vermindern kann (Miró *et al.*, 2005).

Damit in Einklang zu bringen ist eine Untersuchung an 26 Therapienaiven und 10 HIV-negativen Probanden. Um den zusätzlichen Einfluss durch die PI abschätzen zu können, fingen die Patienten eine HAART zunächst mit 2 NRTI an und nahmen anschließend noch einen PI dazu. Die Messungen wurden zur Baseline vor Therapiebeginn, nach 2 Wochen nur mit NRTI, 2 Wochen nach Beginn des PI und nochmals 3 Monate nach Beginn durchgeführt. Die Schlussfolgerung war, dass NRTI die Apoptoseraten (gemessen an CD95-Expression, Apo2.7-Expression und Annexin V-Bindung) der verschiedenen Lymphozytensubpopulationen (CD4-positive und CD8-positive T-Lymphozyten, Gedächtniszellen und NK-Zellen) erhöhen, was auch mit dem typischen Nebenwirkungsspektrum dieser Substanzklasse zu vereinbaren ist. PI hingegen scheinen die Apoptoseraten dieser Zellen vermindern zu können. Bei Patienten mit niedrigerer Helferzellzahl zu Beginn der Therapie gibt es unter einigen Experten die Meinung, dass man primär ein PI-haltiges HAART-Regime wählen sollte, obwohl es dafür keine klinische Evidenz gibt (Wasmuth *et al.*, 2003).

Somit scheinen Proteaseinhibitoren insgesamt einen geringeren Einfluss auf die Funktion der Mitochondrien zu haben, als NRTI.

I.7.4 Einfluss der HIV-Infektion per se auf die mitochondriale Funktion

Allerdings ist nicht nur von antiviralen Medikamenten, sondern auch von der HIV-Infektion selbst bekannt, dass klinische Symptome auftreten können, deren Ursache in einer mitochondrialen Dysfunktion liegt. Der Einfluss der Infektion selbst ist manchmal schwierig von dem der NRTI zu trennen. Es besteht die Möglichkeit, dass die HIV-Infektion für einige dieser Nebenwirkungen, wie beispielsweise der peripheren Neuropathie, prädisponiert. Gesunde Primaten, die mit hohen Dosen Stavudin oder

Zalcitabin behandelt wurden, entwickelten keine periphere Neuropathie, wohingegen bei einigen HIV-Positiven mit einer niedrigeren Dosis Zalcitabin und einer kürzeren Exposition eine periphere Neuropathie zu beobachten war (Schilling *et al.*, 1995, Tsai *et al.*, 1989). Eine Verminderung des mtDNA-Gehalts wurde bei therapienaiven HIV-Patienten beschrieben (Casula *et al.*, 2005, Chiappini *et al.*, 2004). Auch bei der akuten HIV-Infektion konnte eine hohe Apoptoserate der PBMC mit Verminderung des MMP nachgewiesen werden (Cossarizza *et al.*, 1997). Für die HIV-Infektion per se konnte darüber hinaus in vitro ein Einfluss auf die Apoptoserate und auf das MMP nachgewiesen werden. In HeLa-CD4-Zellen, Jurkat-Zellen und 293-Zellen wurde bei Expression des HIV-1 spezifischen Proteins Vpr in den Zellen ein Arrest des Zellzyklus beim Übergang der G2-Phase in die M-Phase festgestellt und es konnte die direkte Aktivierung der Caspase-9 nachgewiesen werden. Die Aktivierung der Caspase-9 führt zur Aktivierung der Effektorcaspase-3 und damit zur Apoptose. Dieser Vorgang geht auch mit einer Freisetzung von Cytochrom-c aus den Mitochondrien in das Cytoplasma und mit einer Verminderung beziehungsweise dem Untergang des mitochondrialen Membranpotentials einher (Mathumani *et al.*, 2002). Somit scheint mitochondriale Dysfunktion in vitro auch direkt durch die HIV-Infektion ausgelöst werden zu können. Auf Grund dieser Beobachtungen wurde postuliert, dass bereits die HIV-Infektion per se diese Veränderungen der mitochondrialen Funktion bewirkt (Sternfeld *et al.*, 2007). Bei einigen HIV-positiven Patienten traten vor Einführung der HAART Lactazidosen auf. Die mitochondriale Dysfunktion könnte zur verstärkten Apoptose verschiedener Zelltypen führen, die bei der HIV-Infektion ebenfalls beobachtet werden kann (Macallan, 2001).

2007 wurde eine Arbeit publiziert, in der der Einfluss der HIV-Infektion selbst und der zusätzliche Einfluss der HAART auf das mitochondriale Membranpotential untersucht wurde. In die Studie eingeschlossen wurden 8 gesunde HIV-negative Probanden, 30 HIV-infizierte therapienaive Patienten und 58 HIV-infizierte Patienten, die eine HAART erhielten. 6 Patienten begannen während der Untersuchungen eine Therapie, so dass diese Patienten im Verlauf untersucht wurden. Das mitochondriale Membranpotential wurde in PBMC mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs JC-1 ermittelt. Bei den 6 Patienten, die eine HAART begannen, stieg das MMP innerhalb von 3 Monaten statistisch signifikant von 555 (jeweils errechnete Mediane der Fluoreszenzintensitäten aus den FACS-Fluoreszenzkanälen FL-2/FL-1 ohne FCCP dividiert durch FL-2/FL-1 mit Zugabe von FCCP) im Mittelwert auf 715. Bei den gesunden Kontrollen betrug das MMP 854,

bei den Therapienaiven 639 und bei den therapierten Patienten 695. Somit war das MMP bei Patienten mit HAART signifikant höher als bei Therapienaiven. Es gab keine Korrelation zwischen Alter und Geschlecht und dem MMP. Die CD4-Zahl korrelierte positiv mit dem MMP, ebenso wie der CD4-Nadir (die niedrigste jemals erreichte CD4-Zahl). Zwischen der Viruslast und dem MMP gab es eine negative Korrelation, wenn man alle HIV-Positiven betrachtete. Es wurde kein Unterschied im MMP zwischen den einzelnen HAART-Regimen beobachtet. Das MMP war bei Patienten mit Lipodystrophie signifikant niedriger als bei Patienten, die diese Nebenwirkung nicht aufwiesen. Die Lactatkonzentration, Transaminasen, Gesamtcholesterin und Triacylglyceride im Serum und die Diagnose einer Fettleber bei den Patienten im Ultraschall korrelierten nicht mit dem MMP (Sternfeld *et al.*, 2007).

I.7.5 Einfluss der NRTI ohne HIV-Infektion auf die mitochondriale Funktion

Eine Situation, in der Nicht-Infizierte einer antiretroviralen Medikation ausgesetzt sind, ist bei der Prävention der perinatalen Übertragung der HIV-Infektion von infizierten Müttern auf das Neugeborene gegeben. Bei der Untersuchung solcher Neugeborener fiel in Kanada auf, dass einige von ihnen anhaltende mitochondriale Dysfunktion (Quotient mtDNA/nDNA erniedrigt) aufwiesen. Die Neugeborenen bekamen Zidovudin von Tag 4 bis Woche 6 nach Geburt. Außerdem wurden die Mütter während der Schwangerschaft antiretroviral behandelt (Côté *et al.*, 2008).

Mallon PWG *et al.* untersuchten die Wirkung von NRTI (randomisiert auf Zidovudin/Lamivudin oder Stavudin/Lamivudin jeweils ohne Begleitmedikation) bei 20 gesunden Probanden auf die Mitochondrien der Adipozyten und der Monozyten über einen Zeitraum von 6 Wochen. In beiden Zelltypen konnte nach 2 Wochen Medikamenteneinnahme bereits eine Reduktion der mtDNA-Transkription und somit des mtDNA-Gehalts festgestellt werden. Diese Veränderung hielt in den Monozyten bis 6 Wochen nach Absetzen der Medikamente an (Mallon *et al.*, 2005).

Literaturrecherchen ergaben jedoch keine *in vivo* Untersuchungen bezüglich des Einflusses einer HIV-PEP, also der Einnahme von neueren NRTI meist in Kombination mit einem PI durch nicht HIV-infizierte Personen, auf das MMP und die Apoptoserate in PBMC.

II Ziele der Studie und Fragestellung

Ziel dieser Studie ist es jetzt zum einen, den mitochondrienschädigenden Einfluss der chronischen Hepatitis B- und C-Infektionen in PBMC bei Patienten und gegebenenfalls den Einfluss verschiedener Medikamente, die im Rahmen der Hepatitistherapie eingesetzt werden auf das MMP und die Apoptoserate zu untersuchen. Dies könnte unter Umständen in Zukunft bei der Dosisanpassung vor allem neuer Medikamente wie zum Beispiel dem Entecavir helfen, falls bekannt würde, dass diese Medikamente starken Einfluss auf das MMP ausüben. Auch würden Veränderungen des mitochondrialen Membranpotentials in den Lymphozyten bei den Hepatitispatienten einen weiteren Hinweis darauf geben, dass die Hepatitis B-Viren und die Hepatitis C-Viren in den Lymphozyten replizieren und die virale Proteinbiosynthese auch in diesen Zellen stattfindet.

Um den alleinigen Einfluss neuerer NRTI in Kombination mit PI auf die Mitochondrien der PBMC bei nicht HIV-Infizierten zu untersuchen, eignen sich Messungen an Patienten, die eine HIV-PEP bekommen. Die Messungen sollten bei den PEP-Patienten wenn möglich zur Baseline vor Beginn der Medikamenteneinnahme, im Rahmen der 2-Wochen-Kontrolle, der 4-Wochen-Kontrolle und nochmals 3 bis 6 Monate nach Beendigung der Therapie erfolgen um zu sehen, ob die eventuell auftretenden Veränderungen reversibel sind.

Da die Apoptose der Zellen mit einer Erniedrigung des mitochondrialen Membranpotentials einhergehen kann erscheint es sinnvoll, sowohl die Apoptoseraten als auch das MMP zu untersuchen.

II.1.1 Hypothesen

Hypothese 1: Das MMP in PBMC bei Patienten mit chronischer Hepatitis B bzw. C ist im Median niedriger, als bei gesunden Probanden.

Hypothese 2: Die Medikamente der HAART führen auch bei HIV-negativen Probanden zu einer Erniedrigung des MMP gegenüber gesunden, nicht therapierten Probanden.

Hypothese 3: Mit einer Verminderung des MMP geht eine Erhöhung der Apoptoserate bei den PBMC einher.

II.1.2 Fragestellungen

II.1.2.1 Hepatitis-Patienten

1. Führt die chronische Infektion mit Hepatitis B oder Hepatitis C zu einer Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) peripherer mononukleärer Zellen des Blutes (PBMC) der betroffenen Patienten?
 - a) Führt die chronische Infektion mit Hepatitis B oder C auch zu Veränderungen der Apoptoserate der PBMC bei diesen Patienten?
 - b) Gibt es diesbezügliche Unterschiede zwischen therapierten und nicht-therapierten Patienten?

II.1.2.2 HIV-PEP Patienten

2. Führen die Medikamente, vor allem Tenofovir plus Emtricitabin in Kombination mit Lopinavir/Ritonavir, die über einen Zeitraum von vier Wochen gegeben werden, zu Veränderungen bezüglich des MMP beziehungsweise der Apoptoserate der PBMC bei den Patienten?
 - a) Führen alleine die Medikamente ohne den Einfluss der HIV-Infektion (also bei HIV-negativ getesteten, gesunden Probanden) zu starken Veränderungen bei MMP und Apoptose in PBMC?
 - b) Korrelieren diese Veränderungen mit aufgetretenen klinischen Nebenwirkungen, Veränderungen der Laborparameter Phosphat, Lactat, Lipase, Creatinin, Harnstoff, TAG, Gesamtcholesterin, Glucose, GOT, GPT, γ -GT, Bilirubin, CRP, CK, neutrophile Granulozyten?

III Studiendesign, Studienteilnehmer, Material und Methoden

III.1 Studiendesign und Studienteilnehmer

Es handelt sich um eine prospektive beobachtende Studie.

Untersucht wurden das MMP und die Apoptoserate bei 4 Kollektiven:

1. Kollektiv gesunder Probanden
2. Patienten mit chronischer Hepatitis B
3. Patienten mit chronischer Hepatitis C
4. Patienten, die eine HIV-Postexpositionsprophylaxe bekamen, im Rahmen der Baseline, der 2-Wochen-, 4 Wochen- und 3-Monatskontrolle.

Rekrutiert und untersucht wurden die Patienten bzw. Probanden im Zeitraum vom 29. Februar 2008 bis 01. Oktober 2008. Alle Patienten wurden bezüglich ihrer Hepatitis in der Infektionsambulanz der medizinischen Poliklinik der LMU München behandelt. Bezüglich Alter (außer Minderjährige) und Geschlecht wurden keine Einschränkungen gemacht.

Die Rekrutierung der Probanden des Normalkollektivs fand überwiegend innerhalb des Personals der Infektionsambulanz und im Bekanntenkreis statt. Des Weiteren wurden Patienten gefragt, die einen Termin in der Infektionsambulanz hatten, weder HIV positiv waren, noch unter einer Hepatitisinfektion litten, keine andere Kontraindikation oder schwerwiegende Comorbidität aufwiesen und ohnehin eine Blutentnahme erhielten.

Ausgeschlossen aus der Studie wurden Minderjährige, Patienten mit Coinfektionen (z. B. HIV und Hepatitis, Hepatitis B und C etc.) und nicht-einwilligungsfähige Patienten. Bei den gesunden Probanden wurde anamnestisch erfragt, ob ein bekannter Diabetes mellitus, eine Hyperlipidämie, eine coronare Herzerkrankung oder pAVK, körperliches Training im Zeitraum von 24 Stunden vor der Blutentnahme, eine Schilddrüsendysfunktion, eine Erkältung oder andere Infektionskrankheiten, ein Tumorleiden, eine bekannte Niereninsuffizienz oder die Einnahme von

Immunsuppressiva vorliegt, was alles Ausschlusskriterien von Normalkollektiv darstellten. Außerdem wurden die regelmäßig eingenommenen Medikamente erfragt. Auf die Anforderung eines Routinelabors wurde bei den Probanden des Normalkollektivs verzichtet, jedoch wurden nur klinisch gesunde Probanden ausgewählt.

Bei allen Patienten, die eine HIV-Postexpositionsprophylaxe erhielten, wurde die Indikation gemäß den deutsch-österreichischen Leitlinien und den europäischen Leitlinien der EACS von Ärzten gestellt, die über Erfahrung in der HIV-Therapie verfügen. Die Patienten erhielten nur dann eine Prophylaxe, wenn sie indiziert war und wenn sie dieser zustimmten.

Außerdem wurden bei den Patienten die Ergebnisse des im Rahmen des Ambulanzbesuches durchgeführten Routinelabors berücksichtigt, vor allem Leber- und Nierenfunktionsparameter, CRP, Creatinkinase, Lactatdehydrogenase, GOT und GPT, γ -GT, Bilirubin, Glucose, Cholesterin und Triacylglyceride, da zusätzliche Erkrankungen, die mit Veränderungen dieser Parameter einhergehen (siehe Ausschlusskriterien Normalkollektiv, Kapitel III.1), ebenfalls Einfluss auf das mitochondriale Membranpotential ausüben können und diese Laborparameter durch die bei einer PEP üblicherweise eingesetzten Medikamente Truvada® und Kaletra® verändert werden können (Shafran *et al.*, 2005, Calza *et al.*, 2003, Anastos *et al.*, 2007).

Die Patienten wurden darüber hinaus bei den Kontrollen zu evtl. aufgetretenen Nebenwirkungen befragt.

III.1.1 Ethik

Die für die Studie in Frage kommenden Patienten wurden durch den behandelnden Arzt mündlich über den Inhalt, den Sinn, die Freiwilligkeit, das Rücktrittsrecht und die mit der Studie verbundenen Risiken bei der Blutentnahme aufgeklärt.

Alle Teilnehmer der Studie gaben ihre Zustimmung durch die Unterschrift auf der Patienteninformation und –einverständniserklärung, die sie vorher durchgelesen haben. Diese Unterschrift war Voraussetzung für die Teilnahme an der Studie. Der Rücktritt

von der Studienteilnahme konnte durch eine weitere Unterschrift in dem entsprechend vorgegebenen Bereich auf der Patienteninformation und –einverständniserklärung gültig gemacht werden. Der Studie wurde ethisch-rechtliche Unbedenklichkeit durch die Ethikkommission des Klinikums der Universität München schriftlich zuerkannt.

III.2 Material

III.2.1 Geräte

Gerät	Hersteller	Modell
Hood	NuAire Biological Safety Cabinets, Plymouth, MN	Model Labgard 437 Class II, Type A2
Hood	Holten	LaminAir Model 1,2
Inkubationsschrank	Heraeus, Hanau	HERAcell
Zentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen	Rotanta/RPC
Zentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg	Centrifuge 5810R
Zellzählssystem	Schärfe System GmbH	CASY®1 Model TT
FACS	Beckton Dickinson GmbH, Heidelberg	FACScan
Vortexgerät	IKA® Werke GmbH & Co KG, Staufen	Vortex-Genie® 2
Mikroskop	Leitz, Wetzlar	Dialux 20 EB

Tabelle III-A Geräte

III.2.2 Pipetten

Hersteller	Modell	Spezifikation
Eppendorf AG, Hamburg	Reference® variabel	0,5 – 10 µl, Bedienungsknopf grau, Nr. 4910 000.018
Eppendorf AG, Hamburg	Reference® variabel	10 – 100 µl, Bedienungsknopf gelb, Nr. 4910 000.042
Eppendorf AG, Hamburg	Reference® variabel	100-1000 µl, Bedienungsknopf blau, Nr. 4910 000.069
Integra Biosciences GmbH, Fernwald	PIPETBOY acu	

Tabelle III-B Pipetten

III.2.3 Software

Messung mit FACS: Beckton Dickinson GmbH, Heidelberg, CellQuest™
Version 3.1

Statistik: GraphPad Prism Version 5.00
SAS Institute Inc. Statistics V 9.2

Abbildungen Dot-Plots: Tree Star Inc. FlowJo 7.2.1

Dokumentation: Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim,
Microsoft® Office Excel 2007

Referenz Manager: Thomson Reuters, New York, NY, EndNote® X

III.2.4 Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Reagenzien

Material	Hersteller	Beschreibung
Blutentnahmesystem	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht	Tri-Natriumcitrat S-Monovette® 10ml 9NC, REF. 02.1067.001
Zentrifugenröhrchen	TPP, Schweiz	15 ml, Kat. Nr. 91015
Zentrifugenröhrchen	TPP, Schweiz	50 ml, Kat. Nr. 91050
FACS-Röhrchen	BD Falcon	Round-Bottom Tubes
Probencups mit Deckel	Schärfe System GmbH	CASY®cups
Pipettenspitzen	Josef Peske oHG	0,5 - 20 µl: Kristall G, Typ Gilson, lang, Art. Nr. 7125-85 „G“
Pipettenspitzen	Josef Peske oHG	1 - 200 µl, Typ Eppendorf, gelb, Art. Nr. 1002-10
Pipettenspitzen	Josef Peske oHG	100 - 1000 µl, universal passend, blau, Art. Nr. 1001-10
Serologische Pipetten	TPP, Schweiz	5 ml, Kat. Nr. 94005
Serologische Pipetten	TPP, Schweiz	10 ml, Kat. Nr. 94010
Eppendorf-Röhrchen	Eppendorf AG, Hamburg	spitze
Eppendorf-Röhrchen	Eppendorf AG, Hamburg	Runde (2 ml)
Zählkammern	HYCOR Biomedical Ltd., Penicuik, UK	KOVA Glasstic® Slide 10 with Grids, Ref. 87144, Lot Nr. 127537
Einmalisolationssittel unsteril	Alto Products	Art. Nr. 485580
Handschuhe	Semperit technische Produkte GmbH, Wien	Semper Care Edition Klasse 1
Unterlagen für Hood	Paul Hartmann AG, Herbrechtingen	Molinea E 40 x 60 cm, Art. Nr. 159930

Tabelle III-C Verbrauchsmaterialien

Substanz	Hersteller	Beschreibung	Lot Nummer
Ficoll	Biochrom AG, Berlin	Biocoll Separating Solution isoton, Dichte 1,077 g/ml	
PBS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich	Dulbecco's PBS (1x) without Ca & Mg, 500 ml, Kat. Nr. H15-002	
RPMI 1640	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich	RPMI 1640 with L-Glutamine, 500 ml, Kat. Nr. E15-840	
FCS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich	Fetal Bovine Serum Gold EU-approved, 500ml, Kat. Nr. A15-101	
Pen/Strep	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich	Penicillin/Streptomycin (100x), 100ml, Kat. Nr. P11-010	
95 % Ethanol	Merck KGaA	Absolut Ethanol	
70 % Ethanol	Apotheke Innenstadt Uni München	5 Liter, Art. Nr. L148	
Lyso-Lösung	Schülke & Mayr	Antifect Lyso FD10, 5 Liter	
Dest. Wasser	B Braun, Melsungen	Aqua ad iniectabilia (Aqua dest), 50 ml, Art. Nr. 3880079	
DMSO	Merck	Dimethylsulfoxid getrocknet, 1 Liter, Art. Nr. 2931	
CASY@ton	Schärfe System GmbH	CASY@ton Isotone Salzlösung, 20 l, Nr.	
Trägerflüssigkeit für Durchflusscytometer	Beckton Dickinson GmbH, Heidelberg	FACS Flow, Kat. Nr. 342003	
Farbstoff für Detektion der Apoptoserate	BD Pharmingen™	FITC Annexin V, für 100 Teste, Materialnummer 556420	88205, 88206, 88208, 03596
Farbstoff für Detektion der toten Zellen	BD Pharmingen™	Propidium Iodide Staining Solution, 2,0 ml, Materialnummer 556463	22314, 58622, 89098
Nährmedium für Annexin-V Färbung	BD Pharmingen™	Annexin V Binding Buffer, 10X Konzentrat, 50 ml, Materialnummer 556454	45953
Farbstoff für MMP-Detektion	Invitrogen Molecular Probes	5,5',6,6'-tetrachloro,1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1), 5 mg, Materialnummer T3168	406564
FCCP	Sigma Aldrich, St. Louis, Steinheim	Carbonyl Cyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon, Nr. C2920-10MG	
Trypanblau steril filtriert			

Tabelle III-D Chemikalien und Reagenzien

III.3 Methodik

III.3.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

FACS steht für „Fluorescence activated cell sorting“ und ist ein Verfahren, welches der Messung verschiedener Eigenschaften von Zellen dient.

Zellen, welche sich in einer Lösung befinden, werden einzeln durch eine Kapillare gesaugt und passieren dabei einen Laserstrahl. Dadurch wird einerseits von den Zellen Streulicht emittiert und andererseits ist es auch möglich, entsprechende Fluoreszenzimpulse verschiedener Farbstoffe, die an die Zellen gebunden werden können zu detektieren. Dadurch lassen sich verschiedene Eigenschaften der Zellen ableiten und auch der jeweilige Zelltyp bestimmen (Darzynkiewicz *et al.*, 2000).

Das Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) dient dabei als Maß für die Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC) dient als Maß für die Granularität. Die Granularität wird durch die Größe und Struktur des Zellkerns und durch sonstige intrazelluläre Bestandteile bestimmt und ist ebenso wie die Zellgröße abhängig vom Zelltyp. Somit lässt sich durch diese Eigenschaften der jeweilige Zelltyp bestimmen (Darzynkiewicz *et al.*, 2000).

Zur weiteren Differenzierung der Zellen können diese noch durch verschiedene Fluoreszenzmarkierte Antikörper markiert werden, die sich zum Beispiel gegen Moleküle der CD-Klasse (Cluster of Differentiation) richten, die in unterschiedlicher Ausprägung auf Leukozyten vorkommen (Pruszek *et al.*, 2009). Apoptotische Zellen können durch Fluoreszenzmarkiertes Annexin V detektiert werden, welches an Phosphatidylserin bindet (Koopman *et al.*, 1994). Außerdem gibt es noch Moleküle mit einer Eigenfluoreszenz, welche mit bestimmten zellulären Bestandteilen reagieren können, zum Beispiel Propidiumiodid, welches an die DNA der Zellen binden kann, wenn die Zellmembranen nicht mehr intakt sind (Darzynkiewicz *et al.*, 2000).

III.3.2 Analyse der durchflusszytometrisch erhobenen Daten

Von Interesse ist nun die Anzahl der Zellen mit einer bestimmten Eigenschaft in der Probe.

Die Darstellung erfolgt mittels so genannter Dot-Plots. Auf der X-Achse (Kanal FL1) wird die Intensität eines Fluoreszenzmarkers und auf der Y-Achse (Kanal FL2) wird die Intensität eines anderen Fluoreszenzmarkers aufgetragen. Jede detektierte Zelle erscheint als ein Punkt (Dot) in der Grafik. Man betrachtet die relative Dichte der Punkte in den verschiedenen Quadranten des Dot-Plots (Lugli *et al.*, 2005).

III.3.3 Automatisches Zellzählssystem Schärfe System GmbH CASY®1 Modell TT

Mit dem automatischen Zellzählssystem ist es möglich, die Anzahl von Zellen in einer Lösung und die Viabilität der Zellen zu ermitteln. Das Prinzip der Messung beruht auf Pulsflächenanalyse.

Die Zellen werden in CASYton®, einer Salzlösung, suspendiert und durch eine Kapillare einer definierten Größe gesaugt. Die Zellen werden zwischen zwei Platinelektroden, an denen ein elektrisches Feld mit niedriger Spannung anliegt, mit einer Frequenz von einer Million Messungen pro Sekunde gescannt. Die Zellen verdrängen eine ihrem Volumen entsprechenden Menge der Salzlösung, woraus eine Widerstandserhöhung resultiert. Dadurch produzieren die Zellen elektrische Signale, während sie das elektrische Feld passieren. Analysiert werden die Amplitude, die Pulsweite, die Dauer und die resultierende Pulsfläche, wodurch ein Rückschluss auf das Zellvolumen getroffen werden kann. Die analysierten Pulsflächen der Zellsignale werden in einem Multikanalanalysator, der 512000 Kanäle besitzt, verarbeitet.

Durch Veränderungen in den Zellmembranen sind Aussagen über die Viabilität der Zellen möglich (alles Herstellerangaben).

CASYton® ist eine geruchlose und farblose isotonische Salzlösung mit physiologischem pH-Wert, welche nur minimale Hintergrundsignale bei der Messung erzeugt. Sie stabilisiert die Zellen, vermindert deren Aggregation und sorgt für die Erhaltung der ursprünglichen Zellgröße. Die CASYcups®, in denen die Zellsuspension aus 50 µl der Probe in 10 ml CASYton® suspendiert wird, bestehen aus Polypropylen.

III.3.4 Vorgehen bei der Messung

Die Patientenprobe wurde mittels Blutabnahme eines Citratröhrchens mit 10 ml Inhalt gewonnen (Hodge *et al.*, 1999, Cassart *et al.*, 2007). Bei den HIV-PEP Patienten erfolgen wenn möglich insgesamt vier dieser Entnahmen im Abstand von jeweils zwei Wochen bzw. zwei Monaten, also insgesamt 40 ml Blut.

III.3.4.1 Isolation der PBMC

Die Bearbeitung und Messung der Patientenprobe erfolgt unmittelbar nach ihrer Gewinnung.

Unter dem Oberbegriff PBMC werden alle Arten von Lymphozyten und Monozyten zusammengefasst, also alle peripheren Blutzellen, die einen runden Kern besitzen. Das bedeutet, dass man bei der Isolation der PBMC mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation die Granulozyten, Erythrozyten und Thrombozyten abtrennt.

Die PBMC erscheinen nach der Zentrifugation als trüber Ring an der Stelle, wo bei der Überschichtung die Grenze zwischen Blut und Ficoll-Lösung war. In dieser Schicht sammeln sich auch die Thrombozyten, deren Anzahl bei den nachfolgenden Waschvorgängen mit PBS vermindert wird. Darüber befindet sich Plasma, ganz unten im Zentrifugationsröhrchen befinden sich die Erythrozyten.

Als erstes wird die Isolation der PBMC mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Hierbei wird zuerst Patientenblut 1:1 mit PBS gemischt. Anschließend werden von dieser Mischung 5 ml auf Ficoll-Lösung überschichtet unter Vermeidung der Vermischung der beiden Phasen. Ficoll ist ein nicht-ionisches, synthetisches Polymer der Saccharose, welches für die Herstellung von Dichtegradienten und somit zur Isolation von PBMC geeignet ist. Es besitzt eine Viskosität von 17 ml/g und hat ein Molekulargewicht von ca. 400 000 g/mol (Datenblatt der Biochrom AG).

Nun wird bei 1500 U/min für 20 Minuten ohne Bremse bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Hierbei entsteht ein Ring aus PBMC, den man mit bloßem Auge als trüben Bereich erkennen kann.

Als nächstes wird dieser PBMC-Ring mit einer Pipette in ein neues Zentrifugationsröhrchen übertragen und ad 10 ml PBS aufgefüllt.

Nach erneuter Zentrifugation bei 1500 U/min für 5 Minuten mit Bremse bei Raumtemperatur erfolgt nun ein zweiter Waschvorgang, bei dem der jetzt entstandene Überstand abgesaugt wird und das PBMC-Zellpellet erneut in 10 ml PBS vorsichtig durch Auf- und Abpipetieren aufgewirbelt wird. Anschließend erfolgt nochmals eine Zentrifugation (1500 U/min, 5 min., mit Bremse, bei RT).

III.3.4.2 JC-1-Färbung, Messung des MMP

Die Messung des mitochondrialen Membranpotentials in peripheren Blutlymphozyten wird mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Dafür werden die Mitochondrien der Zellen mit dem Farbstoff JC-1 gefärbt. Bei den Positivkontrollen erfolgt die Entkopplung der Atmungskette mittels FCCP, wodurch in den Zellen das MMP zusammenbricht (Chaudhari *et al.*, 2008, Muller *et al.*, 2008). Dieses Ergebnis der Positivkontrollen dient dem Nachweis, dass es sich bei dem gemessenen Parameter auch tatsächlich um das MMP handelt und die isolierten Zellen vital waren.

JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyaniniodid) ist ein kationischer Farbstoff, der in Abhängigkeit vom MMP in den Mitochondrien akkumuliert. Angeregt wird JC-1 mit Licht von 488 nm Wellenlänge.

JC-1 kann in Form von Monomeren (Fluoreszenzemission bei 527 nm, entspricht grün, Detektion im Kanal FL-1) oder als J-Aggregate (Fluoreszenzemission bei 590 nm, entspricht rot, Detektion im Kanal FL-2) vorliegen.

Bei hohem mitochondrialem Membranpotential liegen vorwiegend die J-Aggregate vor, was bedeutet, dass der Quotient FL-2/FL-1 groß ist. Bei niedrigem MMP liegen mehr Monomere vor, so dass der Quotient FL-2/FL-1 kleiner wird (Cossarizza *et al.*, 1993). Dieser Quotient wurde zur Quantifizierung des MMP bei der Auswertung herangezogen. JC-1 ist sehr spezifisch für das mitochondriale Membranpotential gegenüber dem Plasmamembranpotential und Größe, Form und Dichte der Mitochondrien beeinflussen

den Fluoreszenzshift nicht. Auch kommt es zu keiner vom MMP unabhängigen Bindung an die Organellen. JC-1 ist als einziger Farbstoff in der Lage, den Zusammenbruch des MMP durch Entkoppler der Atmungskette zu detektieren (Mathur *et al.*, 2000). Deshalb stellt es derzeit den Goldstandard für die Untersuchung des MMP dar (Cossarizza, 2003, Mathur *et al.*, 2000, Salvioli *et al.*, 1997).

FCCP (Trifluorcarboxylcyanidphenylhydrazon) ist ein Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung und führt zum Zusammenbruch des Protonengradienten über der inneren Mitochondrienmembran. FCCP liegt im Cytosol als Anion vor. Es kann an der inneren Mitochondrienmembran, wo ein niedriger pH-Wert vorliegt, ein Proton aufnehmen, in der nun neutralen Form durch die innere Mitochondrienmembran hindurch diffundieren und auf der mitochondrialen Matrixseite, wo der pH-Wert höher ist, wieder dissoziieren. Somit ist es zu einem Nettotransport eines Protons von Intermembranraum in die Mitochondrienmatrix gekommen. Dies führt zu einem Abbau des Protonengradienten und somit zum Erliegen der ATP-Synthese, wobei die ungenutzte Energie in Form von Wärme frei wird (Chaudhari *et al.*, 2008, Rottenberg & Wu, 1998).

Für die JC-1-Färbung wird das jetzt zweimal gewaschene Zellpellet in R 10 Medium (1X RPMI 1640 + 10% FCS + 10 mM HEPES + 2 mM L-Glutamin + 100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin) resuspendiert. Die Konzentration dieser Suspension muss 1×10^6 Zellen/ml betragen. Um dies zu erreichen wird mittels eines automatischen Zellzählsystems (CASY-1®) die Konzentration der Suspension bestimmt. Für das Zellzählsystem werden 10ml CASY®ton mit einem Dispenser in ein CASY®cup gegeben und anschließend 50 µl der Zellsuspension zugegeben. Nach der Zählung wird entsprechend mit so viel RPMI 1640 verdünnt, bis die gewünschte Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml vorliegt. Das JC-1 wurde zuvor in DMSO gelöst und als Aliquots für jeweils eine Messung bei -20°C aufbewahrt.

Nun werden je 1000 µl dieser Suspension (entspricht 1×10^6 Zellen) in zwei FACS-Röhrchen pipettiert und mit jeweils 5 µl JC-1 gefärbt (die JC-1 Konzentration beträgt dann 10 µg/ml). Anschließend erfolgt die Aufteilung in nochmals die Hälfte (jetzt 4 FACS-Röhrchen) und die Inkubation für 15 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ (Cossarizza *et al.*, 1993).

Zum Schluss werden die gefärbten Zellen noch dreimal gewaschen mit jeweils 500 µl PBS und anschließender Zentrifugation bei 900 U/min für 3 Minuten bei RT mit Bremse. Für die Messung wird das Zellpellet in 400 µl PBS resuspendiert. Es werden 50.000 Zellen am FACS gezählt.

Zwei Proben werden nun direkt durchflusszytometrisch untersucht. Die anderen beiden Proben dienen als Positivkontrollen. Hierzu werden exakt eine Minute vor der Messung 16 µl FCCP zugesetzt, um die Atmungskette zu entkoppeln. Dies führt zu einem Zusammenbruch des MMP. Die Positivkontrollen dienen der Validierung der JC-1-Färbung indem gezeigt wird, dass der Zusammenbruch des MMP durch den Farbstoff detektiert wird.

III.3.4.3 Annexin-V-FITC- und PI-Färbung, Messung der Apoptoserate

Die Messung der Apoptoserate peripherer Blutlymphozyten erfolgt ebenfalls mittels Durchflusszytometrie. Dazu werden die Zellen mit fluoreszenzmarkiertem Annexin V (Annexin V-FITC) markiert und anschließend mit Propidiumiodid (PI) gefärbt.

Annexin V ist ein extrazelluläres Matrixprotein, welches eine hohe Affinität zu Phosphatidylserin besitzt und somit daran bindet. Phosphatidylserin ist ein negativ geladenes Membranlipid aller Zellen, welches normalerweise nur in der inneren Lipidschicht der Zellmembran vorkommt. Wird eine Zelle apoptotisch, wechselt Phosphatidylserin durch einen Flip-Flop-Mechanismus, unterstützt durch das Enzym Scramblase, in die äußere Lipidschicht und befindet sich somit auf der Oberfläche der Zelle (siehe Einleitung, Kapitel I.3.1). Dadurch kann Annexin V daran binden und markiert somit die apoptotischen Partikel für Phagozyten.

PI färbt die DNA der Zellen an und kann intakte Zellmembranen nicht durchdringen. Somit sind nur Zellen PI-positiv, bei denen die Zellmembran nicht mehr intakt ist. Dies ist zum Beispiel bei toten Zellen der Fall.

Dieses Färbeverfahren ist in der Lage, zuverlässig zwischen früh- und spätapoptotischen Lymphozyten zu differenzieren (Wilkins *et al.*, 2002).

Für die Markierung mit Annexin V-FITC wird das zweimal gewaschene PBMC-Zellpellet in 1:10 mit PBS verdünntem 1x Binding Buffer (0,01 mM HEPES (pH 7,4), 0,14 M NaCl,

2,5 mM CaCl₂) resuspendiert. Die Konzentration soll 1x10⁶ Zellen/ml betragen. Um dies zu erreichen, wird die Konzentration der Suspension mittels eines automatischen Zellzählsystems (CASY®-1) ermittelt und anschließend entsprechend mit verdünntem 1x Binding Buffer auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

Nun werden je 200 µl (entspricht 2x10⁵ Zellen) in drei FACS-Röhrchen pipettiert und in zwei davon durch die Zugabe von 10 µl Annexin V-FITC markiert. Als nächstes werden zu den beiden markierten Proben 10 µl Propidiumiodid hinzu pipettiert. Die Zellsuspension im dritten Falcon® Röhrchen bleibt ungefärbt und dient als Negativkontrolle. Anschließend erfolgt die Inkubation für 15 Minuten bei RT. Als letztes wird die Suspension mit 800 µl 1x Binding Buffer in allen drei Röhrchen aufgefüllt.

Die Messung am FACS erfolgt dann innerhalb von 10 Minuten, es werden 50.000 Zellen gezählt.

III.3.4.4 Vorgehen bei der Messung der Zellkonzentrationen mittels des automatischen Zellzählsystems Schärfe Systems CASY-1® Model TT:

10 ml einer isotonen Salzlösung (CASY®ton) werden in ein Messgefäß (CASY®cup) gegeben und anschließend 50 µl der Zellsuspension hinzu pipettiert. Somit beträgt die Verdünnung 1:200. Anschließend kann die automatische Messung erfolgen.

Einstellungen des Zellzählers:

Cursor Range: 5.00-11.50 µm

Sample: 400 µl

Dilution: 200

Informationen aus der Zellzählung:

Anzahl der Counts (z.B. 8832), Counts/ml (z.B. 4.416E06), das mittlere Volumen (z.B. 2.451E02 fl) und der mittlere Durchmesser der Zellen (z.B. 7,57 µm). Da sehr viele Zellen gezählt werden, sind die Ergebnisse genauer als bei der manuellen Auszählung im Mikroskop. Die Proben wurden dennoch stichprobenartig im Mikroskop untersucht, um den Anteil toter Zellen mittels Trypanblaufärbung zu überprüfen und den Anteil an Erythrozyten und Thrombozyten in der Probe zu ermitteln.

III.3.4.5 Trypanblaufärbung

10 µl der Zellsuspension wurden in ein Eppendorfröhrchen gegeben, anschließend wurden 70 µl PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ und 20 µl Trypanblau zugegeben. Nach Auftragen von 10 µl dieser gefärbten Suspension in eine Zählkammer erfolgte die Betrachtung im Mikroskop. Ermittelt wurde der Anteil der Zellen, deren Kern mit Trypanblau angefärbt war und der Anteil an Erythrozyten und Thrombozyten im Verhältnis zu den Lymphozyten durch Auszählung von 3 Großkästchen in der Zählkammer. Die mit Trypanblau gefärbten Zellen sind tot und können den Farbstoff nicht mehr hinaus transportieren, somit wurde die Viabilität (Prozent lebende Lymphozyten) der Lymphozyten in der Probe ermittelt (Anzahl blau gefärbter Lymphozyten dividiert durch Anzahl aller Lymphozyten).

Das Vorgehen bei der Messung im Labor wird im Zeitraum der Datenerhebung nicht abgeändert. Die Einstellungen am BD™ FACScan® bleiben während des gesamten Zeitraums unverändert, um die Vergleichbarkeit der erhobenen Messergebnisse zu gewährleisten.

III.3.5 Auswertung

Die Auswertung der Ergebnisse der Durchflusszytometrie erfolgte mit Hilfe der Programme CellQuest und FlowJo. Die PBMC-Population wurde entsprechend im FSC/SSC-Dot-Plot gegatet.

III.3.5.1 Mitochondriales Membranpotential (MMP, $\Delta\Psi_m$)

Die Auswertung der Ergebnisse des JC-1 Assays erfolgte rechnerisch. CellQuest® berechnete die Mittelwerte der beiden Fluoreszenzkanäle FL-1 (grün) und FL-2 (rot). Der Wert für das MMP ergab sich durch die Berechnung der Quotienten Mittelwert FL-2/ Mittelwert FL-1 ohne Zugabe von FCCP.

In der PEP-Kohorte wurde zusätzlich zur weiteren Validierung der Ergebnisse der prozentuale Anteil an Zellen mit vermindertem MMP ausgewertet, wobei die Gates nach einer standardisierten Methode in den Histogrammen gesetzt wurden.

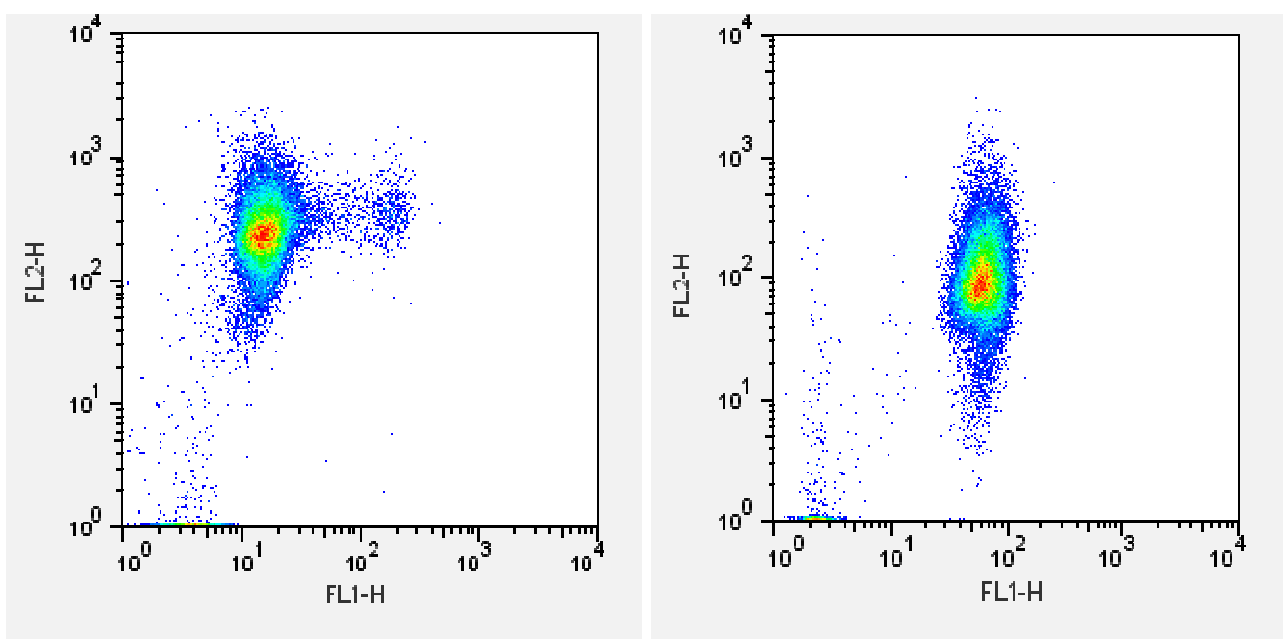


Abbildung III-1 Dot-Plots der JC-1 gefärbten PBMC eines Normalprobanden ohne Zugabe von FCCP (links) und mit Zugabe von FCCP (rechts). Man beachte den Shift der Zellen nach unten und rechts (Zunahme der Intensität im Kanal FL-1, Detektion der Monomere des JC-1, und Abnahme im Kanal FL-2, Detektion der J-Aggregate des JC-1). Dies deutet auf eine Abnahme der J-Aggregate und eine gleichzeitige Zunahme der Monomere hin, was die Verminderung des MMP anzeigt.

III.3.5.2 Apoptose

Die Ergebnisse für die Apoptosemessung mittels Annexin V-FITC und PI können nach Setzen des Gates im FSC/SCC-Scatter auf die PBMC-Fraktion durch direktes Ablesen aus dem Dot-Plot ermittelt werden. Die Negativkontrollen dienen zum Nachweis von eventuell vorhandener Eigenfluoreszenz und zur Überprüfung der korrekten Lage des Gates. Die Intensität des Annexin V-FITC wird auf der X-Achse des Dot-Plots dargestellt (Detektion im Kanal FL1), die Intensität des PI auf der Y-Achse (Detektion im Kanal FL2).

Vitale Zellen sind sowohl Annexin V-FITC negativ als auch PI-negativ, also im linken unteren Quadranten des Dot-Plots zu finden.

Frühe apoptotische Zellen sind hingegen Annexin V-FITC positiv und PI negativ, da ihre Zellmembranen noch intakt sind, also im rechten unteren Quadranten.

Späte apoptotische, nekrotische und bereits tote Zellen sind Annexin V-FITC positiv und PI-positiv, da bei diesen Zellen die Zellmembranen nicht mehr intakt sind und somit Annexin V-FITC an Phosphatidylserin in der inneren Lipidschicht der Zellmembran binden kann und PI in die Zellen eindringen kann. Somit wird die DNA bei diesen Zellen angefärbt. Man findet diese Zellen im rechten oberen Quadranten des Dot-Plots. Ihr Anteil sollte bei Gesunden in der gesamten nicht-gegateten Probe unter 10% liegen, idealerweise sogar unter 5%.

Annexin V-FITC negative und PI-positive Zellen werden als tote Zellen angesehen, wobei deren Anteil sehr gering sein sollte (Wilkins *et al.*, 2002).

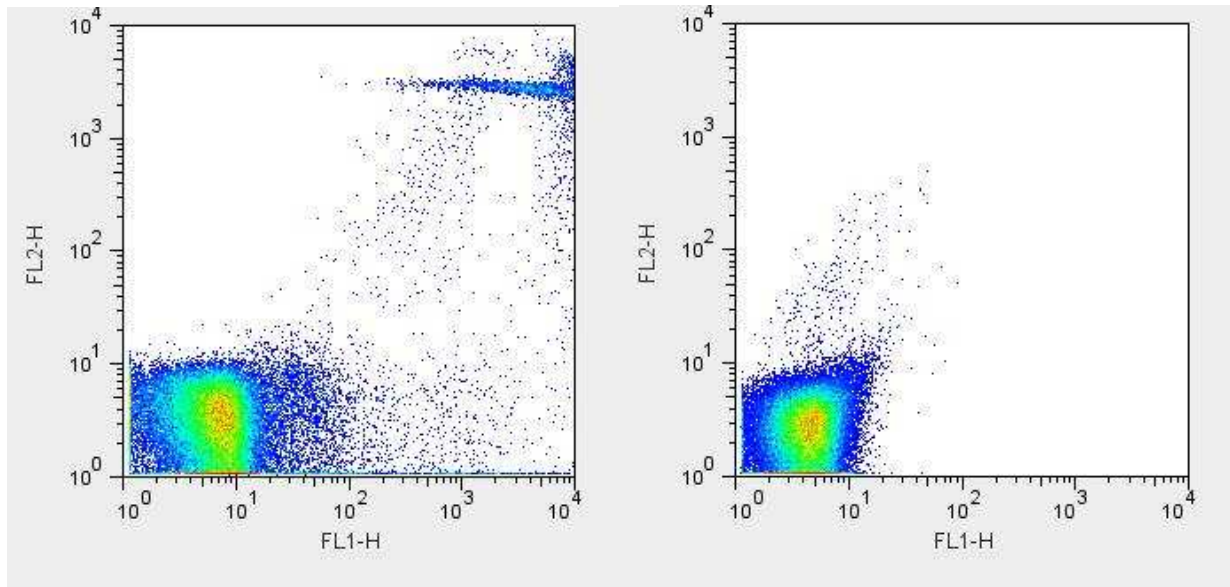


Abbildung III-2 Dot-Plots der Annexin-V-FITC- und PI-gefärbten PBMC (links) und der Erfassung der ungefärbten Zellen als Negativkontrolle (rechts). FL-1: Annexin V-FITC Intensität; FL-2: PI-Intensität. Gates sind nicht mit abgebildet. Man beachte im linken Plot die Zellen, die eine höhere Intensität im Kanal FL-1, aber nicht in FL-2 zeigen (Annexin-V-positiv, PI-negativ, rechts unten im Plot). Diese stellen die Apoptotische Fraktion mit noch intakter Zellmembran dar (nur diese gingen in die Auswertung als Apoptotische Zellen ein). Die Zellen, die sowohl in FL-1 als auch in FL-2 eine hohe Intensität aufweisen (rechts oben im Plot) sind nekrotisch, d. h. die Zellmembran ist nicht mehr intakt und die Zellen sind sowohl Annexin-V- als auch PI-positiv.

Gemessen wurde bei jedem Patienten und Probanden das mitochondriale Membranpotential mittels JC-1-Assay und bei einigen wurde darüber hinaus die Apoptoserate der isolierten Lymphozyten und die Nekroserate der isolierten Zellen mittels Annexin-V-Färbung und PI-Gegenfärbung ermittelt. Die beiden letztgenannten Färbungen wurden nach endgültiger Etablierung und Standardisierung bei allen Patienten und Probanden mit durchgeführt.

Als Qualitätskontrollen für die Messungen diente für die JC-1-Färbung die Ermittlung von Positivkontrollen, wobei das Zusammenbrechen des Protonengradienten über der inneren Mitochondrienmembran durch die Zugabe von FCCP als Bestätigung für die korrekte Durchführung der Färbung diente. Dies wurde bei jeder JC-1-Färbung durchgeführt. Bei einigen Ansätzen wurden außerdem Negativkontrollen mit registriert, um zu sehen, dass die ungefärbten Zellen und andere Bestandteile der Proben in den Dot-Plots nicht erfasst wurden.

Darüber hinaus wurden die Zellen im Rahmen der Annexin V-Färbung mit Propidiumiodid gegengefärbt und somit konnte die Zahl der toten Zellen in der Probe und im Lymphozytengate ermittelt werden. Außerdem wurden stichprobenartig bei einigen Zellpräparationen die Zellen mit Trypanblau gefärbt und auf eine Zählkammer gegeben, um mit Hilfe des Mikroskops die Zahl der toten Zellen in der Probe zu erfassen und zudem die Anzahl und Art der isolierten Zellen, den Anteil an Erythrozyten und Thrombozyten neben den erwünschten Lymphozyten zu überprüfen.

Bei jeder Annexin V- und PI-Färbung wurde des Weiteren eine Negativkontrolle miterfasst, um zu sehen, dass die ungefärbten Zellen als Annexin V- und PI-negativ erfasst wurden.

III.3.5.3 Statistische Auswertung

Die erhobenen Daten bei den Hepatitiskollektiven wurden auf Grund der kleinen Fallzahl als nicht normalverteilt angesehen und somit nur durch nicht-parametrische Testverfahren ausgewertet. Die Angaben der deskriptiven Statistik erfolgten als Median und Spannweite. Angegeben wurden jeweils der Median und der p-Wert. Der Vergleich der MMPs bzw. des Prozentsatzes apoptotischer Zellen zwischen den Hepatitis- und Normalkollektiven erfolgte mittels Mann-Whitney-Tests in GraphPad Prism 5.00. Das MMP und die Apoptoseraten beim PEP-Kollektiv wurden auf Grund einiger fehlender Werte mittels mixed model Analyse für wiederholte Messungen ausgewertet (Wolfinger & Chang). Für den MMP-Abfall und die Änderung der Apoptoserate von der Baseline bis zur 4-Wochen-Kontrolle wurde eine autoregressive Covarianzmatrix verwendet, für den Vergleich der Werte zwischen 4-Wochen- und 3-Monats-Kontrollen eine Unstrukturierte (unstructured) Covarianzmatrix. Untersucht wurde zwischen Baseline und 4-Wochen-Kontrolle der Einfluss sowohl des linearen als auch des quadratischen Terms der Zeit in Tagen unter PEP auf den Abfall des MMP. Alter und Geschlecht wurden auf ihre Eigenschaft als mögliche Störfaktoren untersucht, indem der Einfluss auf den bzw. die Schätzerkoeffizienten für die Zeit unter PEP verglichen wurde. Bei unwesentlichen Unterschieden dieser Koeffizienten mit und ohne die jeweilige Covariate im Modell waren diese keine Störgrößen und mussten im Modell nicht berücksichtigt werden. Die Auswertung des MMP- bzw. Apoptoseratenverlaufs von der

4-Wochen-Kontrolle zur 3-Monats-Kontrolle erfolgte als Vergleich zwischen den Kollektiven zu 2 Zeitpunkten. Hierzu wurde PROC MIXED in SAS[®] 9.2 verwendet. Korrelationen wurden mittels des Spearman-Korrelationskoeffizienten und bei Signifikanz mit anschließender linearer Regression bestimmt.

Als statistisch signifikant angesehen wurden p-Werte $<0,05$ (*), als hoch signifikant bei $p < 0,01$ (**) und von einem Trend wurde bei $p < 0,1$ ausgegangen.

IV Ergebnisse

IV.1 Studienteilnehmer, Zusammensetzung der einzelnen Kollektive, deskriptive Statistik

Rekrutiert wurden die Patienten in der Infektionsambulanz und Tagesklinik der Medizinischen Poliklinik, Campus Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München im Zeitraum vom 29. Februar 2008 bis zum 01. Oktober 2008. An der Studie nahmen insgesamt 71 Patienten und Probanden teil, darunter 15 Patienten mit chronischer Hepatitis B Monoinfektion, 15 Patienten mit chronischer Hepatitis C Monoinfektion, 20 Patienten unter HIV-PEP und zum Vergleich der bei den Patienten ermittelten Werte 21 gesunde Probanden.

IV.2 Zusammensetzung des Normalkollektivs und Matching mit den Patientenkollektiven

Es wurden im Rahmen der Studie 21 gesunde Probanden untersucht, 8 Männer und 13 Frauen. Deren Werte wurden als Anhaltspunkt zum Vergleich mit den Hepatitis-Kollektiven herangezogen und dienten auch zum Vergleich mit den Baselinewerten des PEP-Kollektivs, um die Plausibilität der Ausgangswerte zu überprüfen. Im Vergleich der einzelnen Kollektive wurden die Patienten mit den Probanden nach Alter und Geschlecht gematcht. Das Durchschnittsalter des gesamten Normalkollektivs lag bei 42,7 +/- 13,0 Jahren, das der Männer bei 37,4 +/- 13,6, das der Frauen bei 46,0 +/- 12,0 Jahren.

IV.3 Auswertung des Hepatitis B-Kollektivs

IV.3.1 Klinische Symptome der HBV-Patienten

Alle fünfzehn Patienten wiesen über mehr als 6 Monate HBsAg im Serum auf, womit die Diagnose der chronischen Hepatitis B Virusinfektion gestellt ist. Klinisch zeigten neun Patienten zum Zeitpunkt der Untersuchung keinerlei Beschwerden. Ein Patient hatte eine aktiv progressive Verlaufsform, zwei litten unter Polyarthritits und gesteigerte Müdigkeit, einer beklagte Nachtschweiß ohne weitere Symptome, einer gab Appetitlosigkeit an, einer hatte bei der klinischen Untersuchung einen leichten Druckschmerz in der Leberregion und einer wies einen gelegentlich auftretenden Juckreiz an unterschiedlichen Körperstellen auf. Bei einer Patientin bestand als weitere Diagnose ein Diabetes insipidus. Von zwei Patienten konnten die Symptome einer akuten Infektion mit Ikterus in der Vergangenheit anamnestisch angegeben werden.

IV.3.2 Medikation der HBV-Patienten

Zum Zeitpunkt der Untersuchung waren sieben Patienten untherapiert und hatten keine Therapieindikation, wohingegen acht Patienten eine Therapie erhielten. Ein Patient bekam Peg-IFN α , einer Adefovir + Entecavir, einer Tenofovir + Entecavir, zwei bekamen Lamivudin als Monotherapie und drei nahmen Entecavir als Monotherapie ein.

IV.3.3 Deskriptive Statistik des Hepatitis B-Kollektivs, der gematchten Normalkollektive und der Laborparameter

Im Median zeigte sich beim HBV-Kollektiv kein Laborparameter im pathologischen Bereich. Jedoch zeigten vier Patienten erhöhte Werte für die GOT bis 84 U/l, bei fünf Patienten war die GPT erhöht bis 194 U/l, drei Patienten zeigten erhöhte Bilirubinwerte bis 4,7 mg/dl und die TAG lagen bei drei Patienten außerhalb der Norm mit Werten bis 367 mg/dl.

Parameter	Hepatitis B $\Delta\Psi_m$	Normal gematcht mit HBV $\Delta\Psi_m$	Hepatitis B Apoptoserate	Normal gematcht mit HBV Apoptose
Anzahl gesamt, Alter	15 36,7 +/- 10,7	12 38,2 +/- 13,0	12 38,9 +/- 11,0	10 40,9 +/- 12,6
Männer (Anteil %), Alter	11 (73) 35,1 +/- 10,3	8 (67) 37,4 +/- 13,6	9 (75) 36,7 +/- 10,8	7 (70) 39,1 +/- 13,7
Frauen (Anteil %), Alter	4 (27) 41,0 +/- 12,0	4 (33) 39,8 +/- 13,6	3 (25) 45,0 +/- 11,0	3 (30) 45,0 +/- 10,5
Infektions-dauer [Jahre]	6,75 (0,50; 28,00)	negativ	9,0 (0,5; 28,0)	negativ
Viruslast [IU/ml]	1900 (0; 1,0x10 ⁸)	negativ	1250 (0; 1,0x10 ⁸)	negativ
GOT [U/l]	28 (18; 84 ⁺)	N/A	28 (20; 84 ⁺)	N/A
GPT [U/l]	30 (17; 194 ⁺)	N/A	30,5 (18,0; 194,0 ⁺)	N/A
Γ -GT [U/l]	23 (12; 98)	N/A	23 (12; 98)	N/A
aP [U/l]	66 (46; 77)	N/A	65 (46; 72)	N/A
Bilirubin gesamt [mg/dl]	0,5 (0,2; 4,7 ⁺)	N/A	0,45 (0,20; 4,70 ⁺)	N/A
Lactat [mmol/l]	1,1 (0,7; 2,7)	N/A	1,0 (0,7; 2,1)	N/A
LDH [U/l]	156 (128; 226)	N/A	153 (128; 226)	N/A
CK gesamt [U/l]	143 (58; 257 ⁺)	N/A	111,5 (58,0; 257,0 ⁺)	N/A
Glucose [mg/dl]	87 (77; 140)	N/A	87 (77; 140)	N/A
Cholesterin [mg/dl]	189 (150; 218)	N/A	189 (150; 218)	N/A
HDL [mg/dl]	43 (28; 97)	N/A	42 (28; 91)	N/A
LDL [mg/dl]	107 (83; 139)	N/A	114 (83; 139)	N/A
TAG [mg/dl]	101 (36; 367 ⁺)	N/A	102 (67; 242 ⁺)	N/A
CRP [mg/l]	0,1 (0,1; 0,69)	N/A	0,10 (0,10; 0,69)	N/A
Creatinin [mg/dl]	0,8 (0,6; 1,1)	N/A	0,8 (0,6; 1,1)	N/A
Harnstoff [mg/dl]	14 (11; 22)	N/A	15 (11; 22)	N/A
Erys [Millionen/ μ l]	4,91 (3,87; 5,49)	N/A	4,90 (3,87; 5,46)	N/A
Thrombos [1000x/ μ l]	211 (124; 299)	N/A	211 (125; 243)	N/A
Leukos [1000x/ μ l]	5,3 (3,6; 9,8)	N/A	5,1 (3,6; 9,8)	N/A
Hb [g/dl]	15,3 (13,0; 16,7)	N/A	15,25 (13,00; 16,70)	N/A
Hkt [%]	44,8 (38,3; 48,1)	N/A	44,6 (38,3; 48,1)	N/A
MCV [fl]	90,1 (83,3; 101,0)	N/A	91,2 (86,9; 101,0)	N/A
MCH [pg]	30,8 (27,9; 34,9)	N/A	31,7 (29,3; 34,9)	N/A
MCHC [g/dl]	34,2 (32,6; 35,7)	N/A	34,3 (32,6; 35,7)	N/A
Segmentierte [%]	57 (39; 68)	N/A	56,5 (39,0; 68,0)	N/A
Eosinophile [%]	3 (1; 6)	N/A	3 (1; 6)	N/A
Basophile [%]	1 (0; 1)	N/A	1 (0; 1)	N/A
Lymphozyten [%]	32 (14; 46)	N/A	32,5 (14,0; 46,0)	N/A
Monozyten [%]	8 (0; 13)	N/A	8 (0; 13)	N/A

Tabelle IV-A Charakteristika und Laborwerte des Hepatitis B-Kollektivs. N/A=nicht untersucht,

⁺ =Außerhalb des Normbereiches

IV.4 Vergleichende Teste bei den Hepatitis B-Kollektiven

IV.4.1 Vergleich des Hepatitis-B-Kollektivs mit dem gematchten Normalkollektiv

IV.4.1.1 Auswertung der mitochondrialen Membranpotentiale

Im Mann-Whitney-Test ergab sich kein statistischer Unterschied zwischen den MMPs im Vergleich aller HBV-Patienten mit dem Normalkollektiv ($p=0,9805$) (s. Tabelle IV-B und Abbildung IV-1).

	HBV	Normal
Anzahl Werte	15	12
Median	10,69	10,34
Minimum	5,78	5,63
Maximum	13,67	14,10
Durchgeführter Test	Mann-Whitney-Test	
p-Wert	0,9805	
Unterschied Statistisch signifikant ($p<0,05$)	Nein	

Tabelle IV-B Vergleich MMPs HBV mit Normalkollektiv

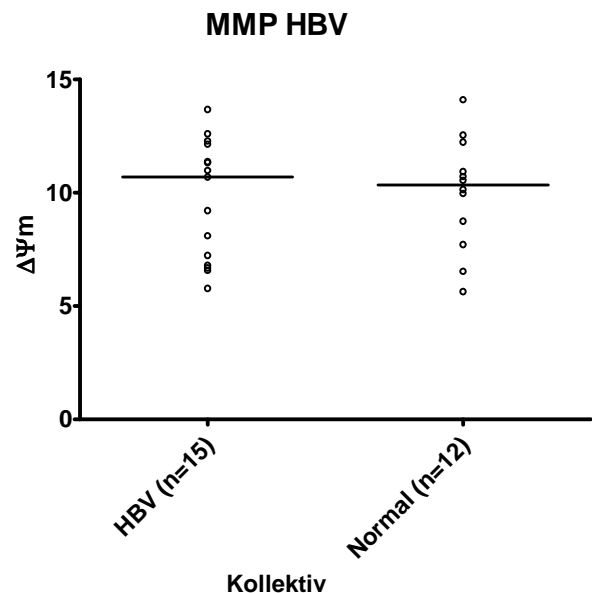


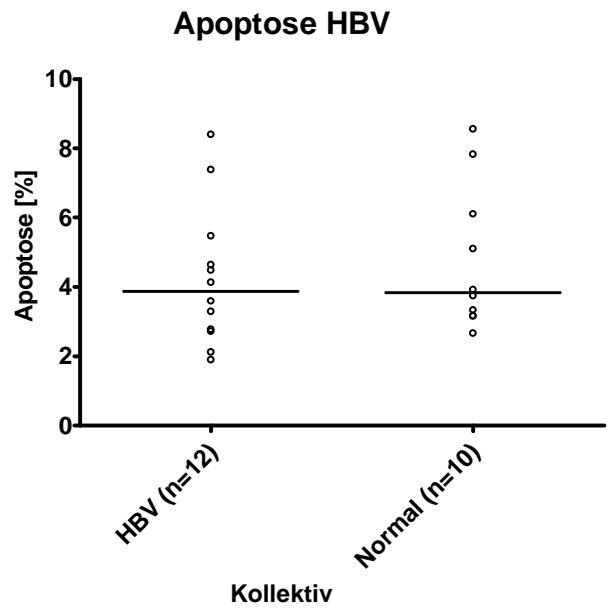
Abbildung IV-1 MMPs der isolierten PBMC. Vergleich des Hepatitis B-Kollektivs mit dem gematchten Normalkollektiv. Angezeigt sind Median und die einzelnen Messwerte

IV.4.1.2 Vergleich der Apoptoseraten

Auch bei den Apoptoseraten konnte mittels Mann-Whitney-Test kein Unterschied zwischen den HBV-Patienten und dem Normalkollektiv festgestellt werden ($p=0,5752$) (s. Tabelle IV-C und Abbildung IV-2).

	HBV	Normal
Anzahl Werte	12	10
Median [%]	3,87	3,84
Minimum [%]	1,90	2,67
Maximum [%]	8,40	8,56
Durchgeführter Test	Mann-Whitney-Test	
p-Wert	0,5752	
Unterschied Statistisch signifikant ($p<0,05$)	Nein	

Tabelle IV-C Vergleich Apoptoseraten HBV mit Normalkollektiv



A

Abbildung IV-2 Apoptoseraten der isolierten PBMC. Vergleich des Hepatitis B-Kollektivs mit dem gematchten Normalkollektiv. Angezeigt sind Mediane und einzelne Messwerte

IV.4.2 Vergleich der Patienten des HBV-Kollektivs, die zum Messzeitpunkt eine Therapie bekamen mit den untherapierten HBV-Patienten

IV.4.2.1 Vergleich der mitochondrialen Membranpotentiale

Zwischen den therapierten und den untherapierten HBV-Patienten unterschieden sich die MMPs im Mann-Whitney-Test nicht ($p=1,0000$) (s. Tabelle IV-D und Abbildung IV-3).

	Therapiert	Untherapiert
Anzahl Werte	8	7
Median	10,84	9,21
Minimum	6,68	5,78
Maximum	12,28	13,67
Durchgeführter Test	Mann-Whitney-Test	
p-Wert	1,0000	
Unterschied Statistisch signifikant ($p < 0,05$)	Nein	

Tabelle IV-D Vergleich MMPs HBV therapiert mit untherapiert

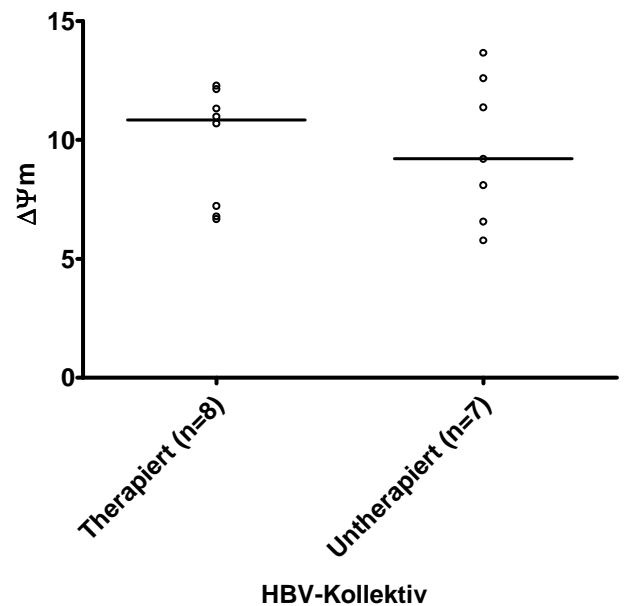


Abbildung IV-3 MMPs der PBMC. Vergleich der HBV-Patienten unter Therapie mit den zum Messzeitpunkt untherapierten Patienten. Angezeigt sind Mediane und die einzelnen Messwerte

IV.4.2.2 Vergleich der Apoptoseraten

Der Mann-Whitney-Test ergab einen Trend zu höheren Apoptoseraten bei den untherapierten HBV-Patienten als bei den Therapierten ($p=0,0931$) (s. Tabelle IV-E und Abbildung IV-4).

	Therapiert	Untherapiert
Anzahl Werte	6	6
Median [%]	2,75	4,40
Minimum [%]	1,90	3,30
Maximum [%]	5,48	8,40
Durchgeführter Test	Mann-Whitney-Test	
p-Wert	0,0931	
Unterschied Statistisch signifikant ($p < 0,05$)	Trend	

Tabelle IV-E Vergleich Apoptoseraten HBV therapiert mit untherapiert

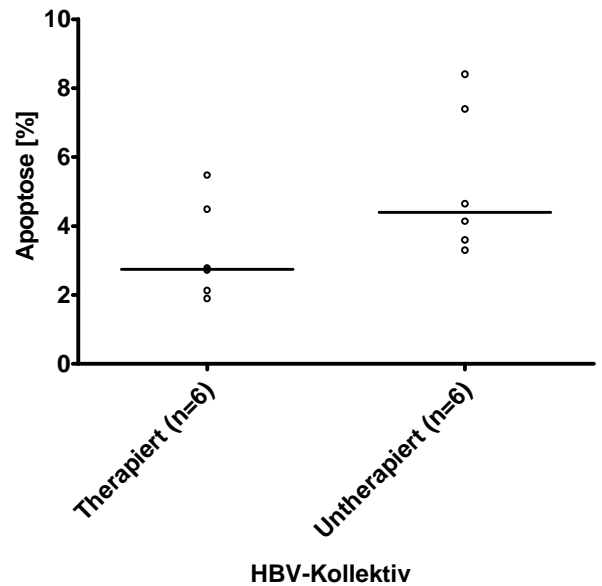


Abbildung IV-4 Apoptoseraten der PBMC. Vergleich der HBV-Patienten unter Therapie mit den zum Messzeitpunkt untherapierten Patienten. Angezeigt sind Mediane und die einzelnen Messwerte

IV.5 Auswertung des Hepatitis C-Kollektivs

IV.5.1 Klinische Symptome der HCV-Patienten

Klinisch waren acht der fünfzehn Patienten nach eigenen Angaben hinsichtlich der Infektion beschwerdefrei, fünf wiesen vermehrte Müdigkeit und Erschöpfung auf, einer klagte über häufige Bauchschmerzen, einer wies eine Leberzirrhose mit Oesophagusvarizen auf, zwei beklagten hellen Stuhl, einer Diarrhoen, einer Gewichtsverlust, einer einen Sklerenikterus und ein Patient hatte nebenbefundlich eine atrophische Gastritis und ein Sjögren-Syndrom, ein anderer eine arterielle Hypertonie.

IV.5.2 Genotypen der Hepatitis C Viren

Bei zwölf von fünfzehn Patienten wurden die Genotypen der Viren bestimmt. Elf Patienten wiesen Viren mit dem Genotyp 1 auf, bei drei davon handelte es sich um den Typ 1a, bei vier lag ein Genotyp 1b vor und bei den restlichen vier wurde keine weitere Subtypisierung vorgenommen. Ein Patient wies Genotyp 2 auf.

IV.5.3 Medikation und Nebenwirkungen der HCV-Patienten

Unter den Patienten mit chronischer Hepatitis C wurden zum Zeitpunkt der Messung zehn Patienten nicht therapiert, fünf bekamen eine Standardtherapie aus Peg-IFN α und Ribavirin. Ein Patient hörte während des Untersuchungszeitraums mit der Therapie nach 48 Wochen auf und wurde erneut einen Monat nach Therapieende untersucht. Zwei Patienten wurden zu zwei Zeitpunkten während der Therapie untersucht (Therapiewochen 5 und 12 bzw. 2 Monate und 6 Monate nach Therapiebeginn). Zwei weitere Patienten fingen mit der Therapie an und beide wurden jeweils vor Beginn und in Therapiewoche 4 und einer nochmals nach 3 Monaten erneut untersucht. Von diesen Patienten wurde in die nicht-gepaarte Auswertung der mitochondrialen Membranpotentiale und der Apoptoseraten im Vergleich zum Normalkollektiv jeweils nur der spätere Messzeitpunkt mit aufgenommen, zu dem parallel auch eine Annexin-V

und eine PI-Färbung durchgeführt wurde, und zwar unabhängig davon, ob dieser mit oder ohne Therapie war, so dass in diesem Vergleich jeder Patient nur einmal ausgewertet wurde. Die verschiedenen Zeitpunkte dieser wenigen Patienten, die entweder mit einer Therapie begannen oder diese beendeten, wurden gemeinsam im Verlauf rein graphisch dargestellt ohne statistische Auswertung (s. Abbildung IV-11).

Die Patienten, die eine Therapie erhielten, klagten als Nebenwirkungen über Depressionen (zwei Patienten), einer wies eine Thrombopenie mit intermittierend Werten von unter 35.000 Thrombozyten/ μ l mit begleitender Leukopenie und Anämie auf. Zwei Patienten waren unter der Kombinationstherapie ohne Nebenwirkungen.

IV.5.4 Deskriptive Statistik des Hepatitis C-Kollektivs, der gematchten Normalkollektive und der Laborparameter

Im Labor zeigten sich erhöhte Mediane nur bei der GPT (51,5 U/l, Maximum 127 U/l) und bei der γ -GT (81 U/l, Maximum 440 U/l). Bei vier Patienten war eine erhöhte GOT mit Werten bis 99 U/l feststellbar, bei drei Patienten eine Bilirubinerhöhung bis 2,3 mg/dl, bei zwei Patienten ein erhöhtes Lactat bis 3,1 mmol/l, bei zwei eine erhöhte LDH bis 348 U/l, bei fünf Patienten war das Gesamtcholesterin bis auf 241 mg/dl erhöht, bei fünf waren die TAG auffällig mit Werten bis 290 mg/dl, zwei zeigten sich anämisch mit Erythrozyten von bis zu 2,92 G/l und einem Hb bis 9,7 g/dl, ein Patient wurde thrombozytopen mit einem Wert von 32.000/ μ l und ein Patient wies eine Neutropenie mit einem Anteil von 23% auf. Keiner der Laborparameter korrelierte mit dem MMP bzw. der Apoptoserate.

Parameter	Hepatitis C ΔΨm	Normal gematcht mit HCV ΔΨm	Hepatitis C Apoptoserate	Normale gematcht mit HCV Apoptose
Anzahl gesamt; Alter	15; 45,7 +/- 12,6	13; 44,9 +/- 12,8	10; 44,9 +/- 11,8	8; 43,0 +/- 12,9
Männer (Anteil %); Alter	8 (53,3); 44,0 +/- 12,8	6 (46); 41,2 +/- 13,7	5 (50); 44,4 +/- 15,9	4 (50); 41,0 +/- 18,1
Frauen (Anteil %); Alter	7 (46,7); 47,7 +/- 13,1	7 (54); 48,0 +/- 12,2	5 (50); 45,4 +/- 7,8	4 (50); 45,0 +/- 7,3
Infektions-dauer [Jahre]	6,0 (0,5; 40,0)	negativ	5,0 (0,5; 35,0)	negativ
Viruslast [IU/ml]	250000 (0; 2,2x10 ⁷)	negativ	100 (0; 484000)	negativ
GOT [U/l]	39 (17; 99 ⁺)	N/A	40 (17; 93 ⁺)	N/A
GPT [U/l]	51,5 ⁺ (15,0; 127,0 ⁺)	N/A	54 ⁺ (15; 127 ⁺)	N/A
Γ-GT [U/l]	81 ⁺ (13; 440)	N/A	101 ⁺ (18; 440)	N/A
aP [U/l]	83,5 (44; 122)	N/A	90 (51; 122)	N/A
Bilirubin gesamt [mg/dl]	0,55 (0,30; 2,30 ⁺)	N/A	0,6 (0,3; 2,3 ⁺)	N/A
Lactat [mmol/l]	1,3 (0,7; 3,1 ⁺)	N/A	1,5 (0,7; 3,1 ⁺)	N/A
LDH [U/l]	183,5 (139,0; 348,0 ⁺)	N/A	196 (139; 348 ⁺)	N/A
CK gesamt [U/l]	63 (33; 150)	N/A	48 (33; 95)	N/A
Glucose [mg/dl]	86 (54; 161)	N/A	83 (54; 161)	N/A
Cholesterin [mg/dl]	176 (118; 241 ⁺)	N/A	180 (118; 241 ⁺)	N/A
HDL [mg/dl]	51 (25; 64)	N/A	52 (25; 64)	N/A
LDL [mg/dl]	90,5 (67,0; 149,0)	N/A	94 (84; 149)	N/A
TAG [mg/dl]	126 (32; 290 ⁺)	N/A	145 (64; 290 ⁺)	N/A
CRP [mg/l]	0,10 (0,05; 0,32)	N/A	0,10 (0,10; 0,32)	N/A
Creatinin [mg/dl]	0,7 (0,5; 0,9)	N/A	0,7 (0,5; 0,9)	N/A
Harnstoff [mg/dl]	10 (6; 22)	N/A	10 (6; 22)	N/A
Erys [Millionen/μl]	4,40 (2,92 ⁺ ; 5,56)	N/A	4,26 (2,92 ⁺ ; 5,56)	N/A
Thrombos [1000x/μl]	195 (32 ⁺ ; 323)	N/A	186 (32 ⁺ ; 319)	N/A
Leukos [1000x/μl]	4,6 (1,8; 10,7)	N/A	4,1 (1,8; 6,8)	N/A
Hb [g/dl]	13,9 (9,7 ⁺ ; 16,7)	N/A	13,4 (9,7 ⁺ ; 16,7)	N/A
Hkt [%]	40,8 (31,3; 50,1)	N/A	40,0 (31,3; 50,1)	N/A
MCV [fl]	90,1 (80,1; 108,0)	N/A	95,15 (80,10; 108,00)	N/A
MCH [pg]	30,9 (27,7; 34,0)	N/A	32,05 (27,70; 34,00)	N/A
MCHC [g/dl]	34,0 (31,0; 35,3)	N/A	33,5 (31,0; 34,9)	N/A
Segmentierte [%]	53 (23 ⁺ ; 75)	N/A	49,5 (23,0 ⁺ ; 75,0)	N/A
Eosinophile [%]	1 (0; 7)	N/A	1 (0; 7)	N/A
Basophile [%]	0 (0; 1)	N/A	0 (0; 1)	N/A
Lymphozyten [%]	36 (17; 63)	N/A	35 (17; 63)	N/A
Monozyten [%]	10 (6; 18)	N/A	11 (7; 18)	N/A

Tabelle IV-F Charakteristika und Laborwerte des Hepatitis C-Kollektivs. N/A=nicht untersucht,
⁺ =Außerhalb des Normbereiches

IV.6 Vergleichende Teste bei den Hepatitis C-Kollektiven

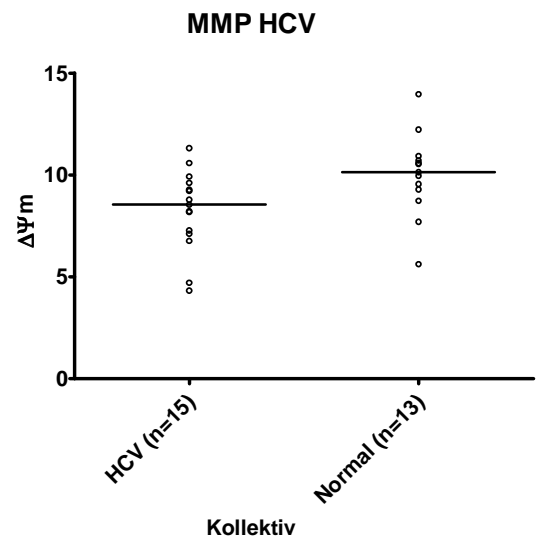
IV.6.1 Vergleich des Hepatitis C-Kollektivs mit dem gematchten Normalkollektiv

IV.6.1.1 Vergleich der mitochondrialen Membranpotentiale

Die MMPs waren bei den allen HCV-Patienten zusammengenommen (also mit und ohne Therapie) im Mann-Whitney-Test signifikant niedriger als beim Normalkollektiv ($p=0,0240$) (s. Tabelle IV-G und Abbildung IV-5).

	HCV	Normal
Anzahl Werte	15	13
Median	8,55	10,14
Minimum	4,33	5,63
Maximum	11,32	13,97
Durchgeführter Test	Mann-Whitney-Test	
p-Wert	0,0240*	
Unterschied Statistisch signifikant ($p<0,05$)	Ja	

Tabelle IV-G Vergleich MMPs HCV mit Normalkollektiv



A

Abbildung IV-5 MMPs der isolierten PBMC. Vergleich des Hepatitis C-Kollektivs mit dem gematchten Normalkollektiv. Angezeigt sind Mediane und die einzelnen Messwerte

IV.6.1.2 Vergleich der Apoptoseraten

Die Apoptoseraten unterschieden sich bei den HCV-Patienten und dem Normalkollektiv im Mann-Whitney-Test nicht ($p=0,5726$) (s. Tabelle IV-H und Abbildung IV-6).

	HCV	Normal
Anzahl Werte	10	8
Median [%]	3,85	4,41
Minimum [%]	1,71	3,15
Maximum [%]	6,95	8,56
Durchgeführter Test	Mann-Whitney-Test	
p-Wert	0,5726	
Unterschied Statistisch signifikant ($p<0,05$)	Nein	

Tabelle IV-H Vergleich Apoptoseraten HCV mit Normalkollektiv

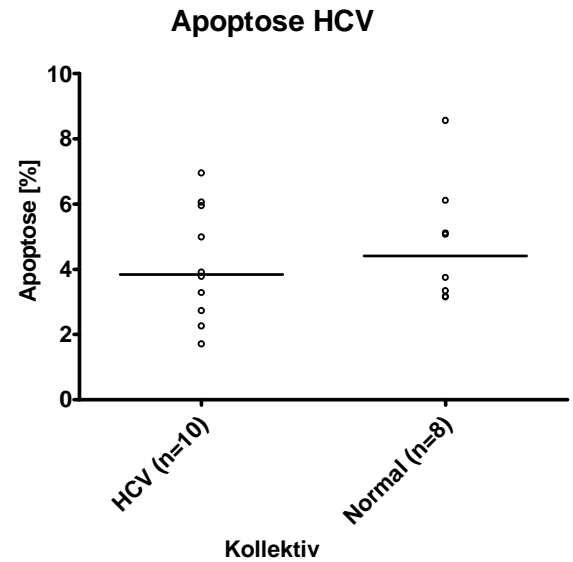


Abbildung IV-6 Apoptoseraten der isolierten PBMC. Vergleich des Hepatitis C-Kollektivs mit dem gematchten Normalkollektiv. Angezeigt sind Mediane und die einzelnen Messwerte

IV.6.2 Vergleich der Patienten des HCV-Kollektivs, die zum Messzeitpunkt eine Therapie bekamen mit den untherapierten HCV-Patienten

IV.6.2.1 Vergleich der mitochondrialen Membranpotentiale

Beim Vergleich der HCV Patienten mit und ohne Therapie mittels Mann-Whitney-Test lagen die MMPs bei den Therapierten statistisch im Trend niedriger ($p=0,0753$) (s. Tabelle IV-I und Abbildung IV-7).

	Therapiert	Untherapiert
Anzahl Werte	5	10
Median [%]	8,18	9,25
Minimum [%]	4,33	4,72
Maximum [%]	8,55	11,32
Durchgeführter Test	Mann-Whitney-Test	
p-Wert	0,0753	
Unterschied Statistisch signifikant ($p < 0,05$)	Trend	

Tabelle IV-I Vergleich MMPs HCV therapiert mit untherapiert

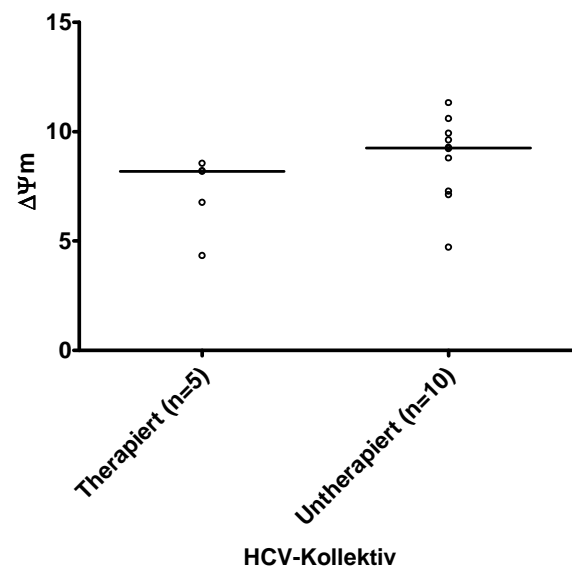


Abbildung IV-7 MMPs der PBMC. Vergleich der HCV-Patienten unter Therapie mit den zum Messzeitpunkt untherapierten Patienten. Angezeigt sind Mediane und die einzelnen Messwerte

IV.6.2.2 Vergleich der Apoptoseraten

Der Mann-Whitney-Test erbrachte keinen Unterschied der Apoptoseraten bei den HCV-Patienten mit und ohne Therapie ($p=0,5476$) (s. Tabelle IV-J und Abbildung IV-8).

	Therapiert	Untherapiert
Anzahl Werte	5	5
Median [%]	3,28	3,91
Minimum [%]	2,26	1,71
Maximum [%]	5,95	6,95
Durchgeführter Test	Mann-Whitney-Test	
p-Wert	0,5476	
Unterschied Statistisch signifikant ($p < 0,05$)	Nein	

Tabelle IV-J Vergleich Apoptoseraten HCV therapiert mit untherapiert

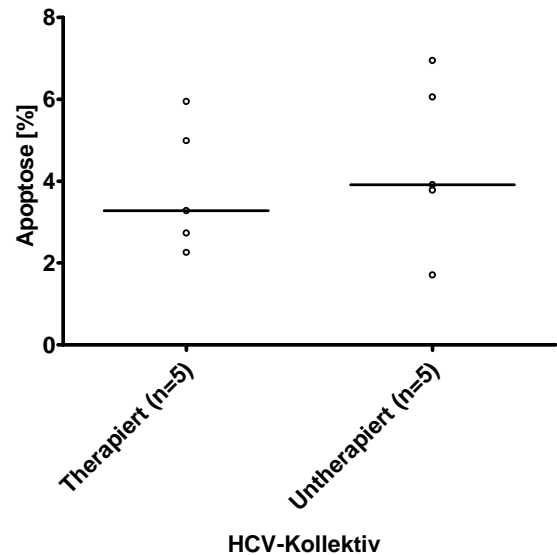


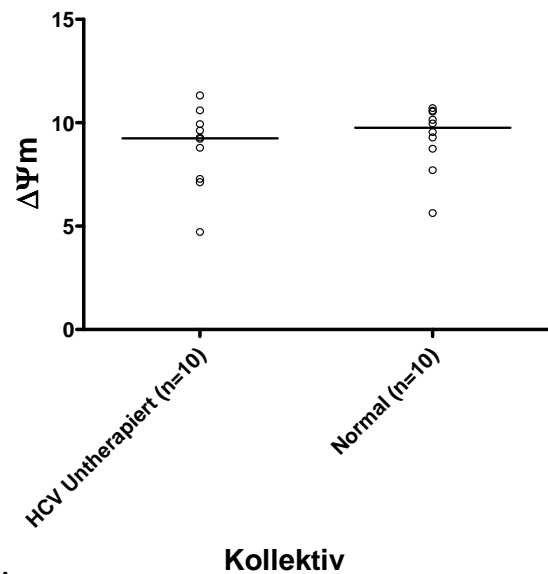
Abbildung IV-8 Apoptoseraten der PBMC. Vergleich der HCV-Patienten unter Therapie mit den zum Messzeitpunkt untherapierten Patienten. Angezeigt sind Mediane und die einzelnen Messwerte

IV.6.2.3 Vergleich der MMPs der untherapierten HCV-Patienten mit gematchten Normalprobanden

Im Mann-Whitney-Test zeigte sich beim Vergleich der HCV-Patienten ohne Therapie mit dem Normalkollektiv kein Unterschied bei den MMPs ($p=0,4813$) (s. Tabelle IV-K und Abbildung IV-9).

	Untherapiert	Normal
Anzahl Werte	10	10
Median [%]	9,25	9,76
Minimum [%]	4,72	5,63
Maximum [%]	11,32	10,71
Durchgeführter Test	Mann-Whitney-Test	
p-Wert	0,4813	
Unterschied Statistisch signifikant ($p < 0,05$)	nein	

Tabelle IV-K Vergleich MMPs HCV untherapiert mit Normalkollektiv



A

Abbildung IV-9 MMPs der PBMC. Vergleich der zum Messzeitpunkt untherapierten HCV-Patienten mit gematchten Normalprobanden. Angezeigt sind Mediane und die einzelnen Messwerte

IV.6.2.4 Vergleich der MMPs der therapierten HCV-Patienten mit gematchten Normalprobanden

Der Mann-Whitney-Test ergab bei den HCV-Patienten mit Therapie einen Trend zu niedrigeren MMPs im Vergleich zum Normalkollektiv ($p=0,0952$) (s. Tabelle IV-L und Abbildung IV-10).

	Therapiert	Normal
Anzahl Werte	5	5
Median [%]	8,18	10,93
Minimum [%]	4,33	5,63
Maximum [%]	8,55	13,97
Durchgeführter Test	Mann-Whitney-Test	
p-Wert	0,0952	
Unterschied Statistisch signifikant ($p < 0,05$)	Trend	

Tabelle IV-L Vergleich MMPs HCV therapiert mit Normalkollektiv

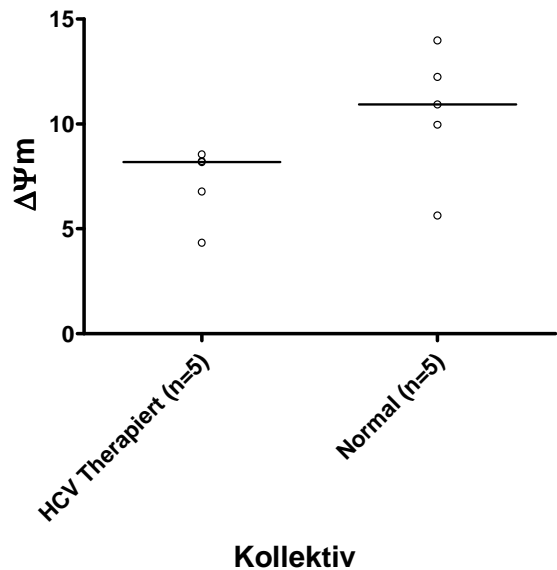


Abbildung IV-10 Mitochondriale Membranpotentiale der PBMC. Vergleich der HCV-Patienten unter Therapie mit gematchten Normalprobanden. Angezeigt sind Mediane und die einzelnen Messwerte

IV.6.3 Verlauf der mehrfach untersuchten Patienten unter der HCV-Therapie

IV.6.3.1 Verlauf der mitochondrialen Membranpotentiale

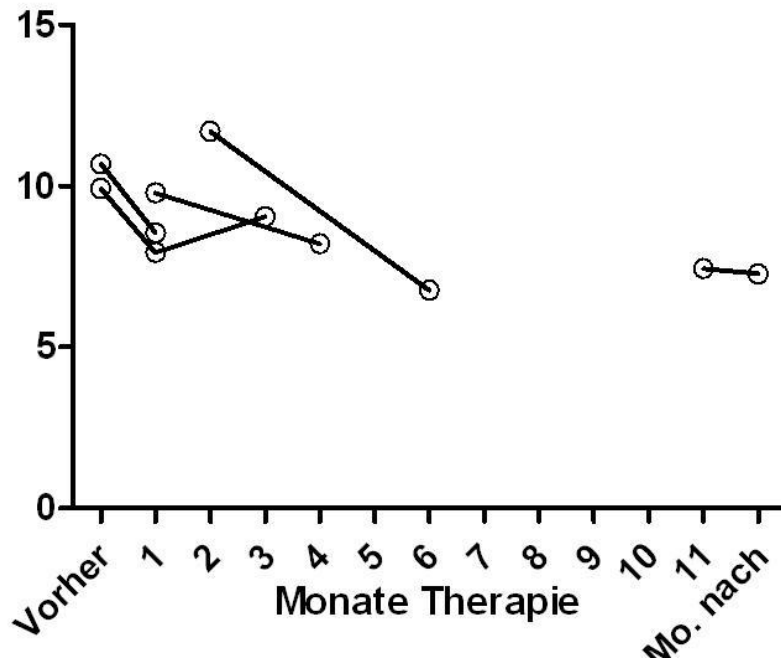


Abbildung IV-11

Verlauf des MMP [FL-2/FL-1] unter Therapie mit Interferon- α und Ribavirin bei verschiedenen Patienten. Die Werte eines Patienten im Verlauf sind jeweils miteinander verbunden. Auf Grund der kleinen Fallzahl erfolgte keine statistische Auswertung. Graphisch zeigt sich der Trend zu einer Verminderung des MMP nach Beginn bzw. während der Therapie.

IV.7 Studienteilnehmer, Zusammensetzung der einzelnen Kollektive und deren deskriptive Statistik: PEP-Kollektive

IV.7.1 Zusammensetzung des PEP-Kollektivs

Messungen erfolgten wenn möglich vor der ersten Einnahme der PEP-Medikation, die Resultate dieser Messungen wurden als Baseline zusammengefasst. Der zweite Messzeitpunkt fand im Rahmen der 2-Wochen-Kontrolle statt, der dritte Messzeitpunkt bei der 4-Wochen-Kontrolle, das heißt im Idealfall am Tag der letzten Medikamenteneinnahme. Bei einigen Patienten konnte erneut zur 3-Monats-Kontrolle, also 2 Monate nach Beendigung der Medikamenteneinnahme, eine Messung durchgeführt werden.

Als Medikamente wurde bei 18 Patienten Truvada® (Emtricitabin 200mg + Tenofovir 245mg) 1-0-0 + Kaletra® (Lopinavir 400mg/Ritonavir 100mg) 2-0-2 eingesetzt, ein Patient bekam Combivir® (Lamivudin 150mg + Zidovudin 300mg) 1-0-1 + Kaletra® (Lopinavir 400mg/Ritonavir 100mg) 2-0-2 und eine Patientin nahm auf Grund einer aufgetretenen schweren Diarrhoe nur Truvada® (Emtricitabin 200mg + Tenofovir 245mg) 1-0-0 ein und setzte Kaletra® (Lopinavir 400mg/Ritonavir 100mg) nach Rücksprache ab.

Zwei Patienten nahmen die ersten 2 Wochen versehentlich Truvada® (Emtricitabin 200mg + Tenofovir 245mg) 1-0-1 anstatt 1-0-0 in Kombination mit Kaletra® (Lopinavir 400mg/Ritonavir 100mg) 2-0-2, die letzten 2 Wochen ihrer PEP dann die korrekte Dosis Truvada® 1-0-0 mit Kaletra® 2-0-2.

Es war nicht möglich jeden Patienten zu allen Zeitpunkten zu erfassen, da die Patienten ihre vereinbarten Termine nicht immer einhielten und teilweise initial (also zur Baseline) an anderer Stelle behandelt wurden. Daher liegt für das mitochondriale Membranpotential nur von 3 Patienten ein gesamtes Follow-up inklusive 3-Monats-Kontrolle vor, von 8 Patienten liegen Baselinewerte, 2-Wochen- und 4-Wochen-Werte vor. Insgesamt lagen zur Auswertung für das mitochondriale Membranpotential zehn Baselinewerte, achtzehn 2-Wochen-Werte, sechzehn 4-Wochen-Werte und sieben 3-Monats-Werte vor. Für die Auswertung der Apoptoseraten wurden fünf Baselinewerte, dreizehn 2-Wochen-Werte, zehn 4-Wochen-Werte und sieben 3-Monats-Werte ermittelt.

Die Auswertung erfolgte sowohl für das mitochondriale Membranpotential, als auch für die Apoptoseraten deswegen mit Hilfe einer Mixed Model Analyse (SAS[®] PROC MIXED Test für wiederholte Messungen) (Wolfinger & Chang). Für die Analyse wurden als Untersuchungszeitpunkt die exakten Tage nach Beginn der PEP ausgewertet, es wurden alle durchgeführten Messungen berücksichtigt. Es wurden getrennte Analysen für den Zeitraum von der Baseline bis zur 4-Wochen-Kontrolle und zwischen der 4-Wochen-Kontrolle und der 3-Monats-Kontrolle durchgeführt, da während der Medikamenteneinnahme eine Abnahme des MMP angenommen wurde und nach Absetzen der Medikamente ein erneuter Anstieg.

IV.7.2 Für PEP gematchtes Normalkollektiv

Das für das PEP-Kollektiv gematchte Normalkollektiv sowohl für die MMP-Auswertung als auch für die Apoptoseauswertung setzte sich wie folgt zusammen:

Insgesamt 9 Personen (35,7 +/- 9,5 Jahre), 6 Männer (35,2 +/- 9,6 Jahre) und 3 Frauen (36,7 +/- 11,4 Jahre).

IV.7.3 Deskriptive Statistik der PEP-Kollektive und der Laborparameter

Im Labor zeigten sich zur Baseline im Median keine pathologischen Werte, jedoch war bei einem Patient die Gesamt-CK auf 487 U/l erhöht und zwei hatten auffällige TAG bis 401 mg/dl. Zur 2-Wochen-Kontrolle zeigte ein Patient einen Anstieg der GOT auf 88 U/l, der GPT auf 155 U/l und der γ -GT auf 205 U/l. Zur 4-Wochen-Kontrolle waren diese Parameter bei zwei Patienten auffällig geworden mit Werten der GOT bis 89 U/l, der GPT bis 155 U/l und der γ -GT bis 267 U/l. Bei der 3-Monats-Kontrolle zeigte einer der Patienten immer noch eine Erhöhung dieser Werte (GOT 60 U/l, GPT 95 U/l, γ -GT 214 U/l). Lactat stieg zur 2-Wochen-Kontrolle bei einem der Patienten auf 3,0 mmol/l, bei der 4-Wochen-Kontrolle war es bereits wieder unauffällig. Fünf Patienten zeigten zur 2-Wochen-Kontrolle eine erhöhte Gesamt-CK bis 517 U/l, bei der 4-Wochen-Kontrolle war sie noch bei vier Patienten auffällig mit einem Maximalwert von 864 U/l, bei der 3-Monats-Kontrolle zeigten drei Patienten eine CK-Erhöhung mit einem Maximalwert von 1513 U/l. Bezüglich des Lipidpanels war zur 2-Wochen-Kontrolle bei fünf Patienten das Gesamtcholesterin mit Werten bis 280 mg/dl angestiegen und fünf zeigten TAG-

Erhöhungen bis 594 mg/dl. Zur 4-Wochen-Kontrolle zeigten zwei Patienten eine Hypercholesterinämie (bis 280 mg/dl), einer der Patienten wies ein erhöhtes LDL auf (185 mg/dl) und bei sieben Patienten waren die TAG erhöht (bis 315 mg/dl). Die TAG waren bei fünf Patienten zur 3-Monats-Kontrolle immer noch erhöht (bis 231 mg/dl), wohingegen die anderen Lipide bereits wieder unauffällig waren. Die Lipase war bei der 2-Wochen-Kontrolle bei zwei Patienten leicht auffällig bis 72 U/l, zur 4-Wochen-Kontrolle bei allen unauffällig. Ein Patient präsentierte sich zur 2-Wochen-Kontrolle thrombozytopen (97.000/ μ l). Zur 4-Wochen-Kontrolle hatte ein Patient ein leicht auffälliges CRP (1,24 mg/dl), bei der 3-Monats-Kontrolle war es bei einem anderen leicht erhöht (0,66 mg/dl). Schließlich war zur 4-Wochen-Kontrolle noch ein Patient mit einer leichten Eosinophilie von 11% aufgefallen und einer mit einem erniedrigten Lymphozytenanteil von 10% im Differential-Blutbild. Auch ist es insgesamt zu einer leichten Verminderung der Leukozyten im peripheren Blut gekommen, die bei der 2-Wochen-Kontrolle am deutlichsten war (zur Baseline Median 7650/ μ l, Minimum 6200/ μ l, bei 2-Wochen-Kontrolle Median 5800/ μ l, Minimum 4300/ μ l), zur 4-Wochen-Kontrolle hatte der Median der Leukozytenkonzentration im Blut wieder zugenommen (6300/ μ l, Minimum 3900/ μ l).

Parameter	Baseline $\Delta\Psi_m$	2-Wochen- Kontrolle $\Delta\Psi_m$	4-Wochen- Kontrolle $\Delta\Psi_m$	3-Monats- Kontrolle $\Delta\Psi_m$	Baseline Apoptoserate	2-Wochen- Kontrolle Apoptose- rate	4-Wochen- Kontrolle Apoptoserate	3-Monats- Kontrolle Apoptose- rate
Anzahl gesamt,	10	18	16	7	5	14	10	7
Alter [Jahre]	35,90 +/- 9,183	33,94 +/- 8,235	34,88 +/- 8,461	32,25 +/- 6,671	42,00 +/- 8,062	34,86 +/- 8,619	35,70 +/- 9,322	30,86 +/- 5,900
Männer (Anteil %), Alter [Jahre]	7 (70) 37,00 +/- 8,544	14 (78) 33,64 +/- 7,948	14 (88) 34,79 +/- 7,886	5 (71) 35,60 +/- 6,107	4 (80) 40,75 +/- 8,732	12 (86) 33,42 +/- 8,350	9 (90) 34,44 +/- 8,946	5 (71) 32,60 +/- 5,983
Frauen (Anteil %), Alter [Jahre]	3 (30) 33,33 +/- 12,10	4 (22) 35,00 +/- 10,42	2 (12) 35,50 +/- 16,26	2 (29) 26,50 +/- 3,536	1 (20) 47,00 +/- 0	2 (14) 43,50 +/- 4,950	1 (10) 47,00 +/- 0	2 (29) 26,50 +/- 3,536
HIV-infiziert	0	0	0	0	0	0	0	0
GOT [U/l]	21 (20; 44)	27 (17; 88†)	24 (14; 89†)	26 (15; 60†)	20 (20; 28)	27 (17; 88†)	26 (14; 89†)	21 (15; 60†)
GPT [U/l]	21,5 (18,0; 38,0)	24,5 (10,0; 185,0†)	22,5 (16,0; 155,0†)	25 (18; 95†)	21 (18; 38)	24,5 (10,0; 185,0†)	23,5 (16,0; 155,0†)	25 (18; 95†)
Γ -GT [U/l]	22 (15; 39)	24,5 (14,0; 205,0†)	27,5 (16,0; 267,0†)	24 (13; 214†)	29 (21; 39)	29 (14; 205†)	30 (16; 267†)	24 (13; 214†)
aP [U/l]	54 (33; 63)	56,5 (29,0; 85,0)	61 (44; 86)	54,5 (46,0; 74,0)	60 (33; 63)	58,5 (29,0; 85,0)	55 (44; 86)	55 (46; 74)
Bilirubin gesamt [mg/dl]	1,1 (0,3; 1,8)	0,8 (0,3; 1,7)	0,6 (0,2; 1,3)	0,45 (0,30; 1,00)	1,3 (0,7; 1,8)	0,9 (0,3; 1,7)	0,7 (0,3; 1,3)	0,5 (0,3; 1,0)

Tabelle IV-M Teil 1 Charakteristika und Laborwerte der PEP-Kollektive. † =Außerhalb des Normbereiches

Parameter	Baseline $\Delta\Psi m$	2-Wochen- Kontrolle $\Delta\Psi m$	4-Wochen- Kontrolle $\Delta\Psi m$	3-Monats- Kontrolle $\Delta\Psi m$	Baseline Apoptoserate	2-Wochen- Kontrolle Apoptose- rate	4-Wochen- Kontrolle Apoptoserate	3-Monats- Kontrolle Apoptose- rate
Lactat [mmol/l]	1,35 (0,90; 2,00)	1,55 (0,70; 3,00†)	1,2 (0,7; 2,0)	1,6 (1,0; 2,7)	1,1 (0,9; 2,0)	1,55 (0,70; 2,30)	1,15 (0,70; 1,70)	1,7 (1,3; 2,7)
LDH [U/l]	158 (128; 189)	158,5 (97,0; 218,0)	152,5 (104,0; 209,0)	147 (129; 243)	149 (128; 189)	167 (97; 218)	152,5 (104,0; 209,0)	156 (129; 243)
CK gesamt [U/l]	120 (34; 487†)	115,5 (47,0; 517,0†)	112 (45; 864†)	129 (38; 1513†)	120 (77; 173)	115,5 (59,0; 309,0†)	102 (71; 864†)	122,5 (38,0; 1513,0†)
Glucose [mg/dl]	86 (59; 125)	85 (69; 127)	85 (64; 131)	85 (55; 101)	88 (85; 125)	88,5 (69,0; 127,0)	86 (64; 131)	87 (67; 101)
Gesamt- Cholesterin [mg/dl]	170 (162; 186)	175 (142; 280†)	170 (81; 286†)	176,5 (146,0; 194,0)	170,5 (168,0; 177,0)	168 (142; 280†)	168,5 (81,0; 251,0†)	185 (149; 194)
HDL [mg/dl]	63 (26; 111)	48 (33; 92)	46 (30; 76)	44 (37; 46)	51 (26; 111)	48 (33; 92)	48 (30; 76)	44,5 (37,0; 46,0)
LDL [mg/dl]	85 (60; 92)	83,5 (45,0; 125,0)	97 (20; 185†)	82 (65; 113)	74,5 (60,0; 88,0)	83,5 (45,0; 125,0)	95 (20; 157†)	95 (65; 113)
TAG [mg/dl]	114 (32; 401†)	151 (80; 594†)	144 (68; 315†)	167,5 (74,0; 231,0†)	157,5 (32,0; 401,0†)	155 (82; 594†)	101,5 (68,0; 295,0†)	173 (74; 231†)
CRP [mg/l]	0,10 (0,10; 0,33)	0,10 (0,10; 0,37)	0,12 (0,10; 1,24†)	0,12 (0,10; 0,66†)	0,1 (0,1; 0,1)	0,10 (0,10; 0,37)	0,11 (0,10; 1,24†)	0,12 (0,10; 0,66†)
Creatinin [mg/dl]	0,95 (0,60; 1,30)	0,95 (0,60; 1,20)	0,9 (0,6; 1,3)	0,9 (0,6; 1,3)	0,9 (0,7; 1,0)	0,95 (0,80; 1,10)	0,9 (0,7; 1,3)	0,9 (0,6; 1,3)
Harnstoff [mg/dl]	11 (6; 21)	16 (7; 23)	17 (10; 23)	15 (9; 22)	11 (10; 21)	16 (12; 23)	17,5 (13,0; 23,0)	13,5 (9,0; 22,0)
Phosphat [mmol/l]	2,2 (1,7; 2,9)	2,4 (1,2; 3,7)	2,8† (1,6; 5,0)	2,1 (2,1; 2,1)	2,15 (1,70; 2,60)	2,3 (1,2; 2,9)	2,9† (1,6; 5,0)	2,1 (2,1; 2,1)
Lipase [U/l]	27 (24; 64)	37,5 (22,0; 72,0†)	29,5 (26,0; 59,0)	32 (32; 32)	24 (24; 64)	38 (22; 72†)	33 (28; 59)	N/A

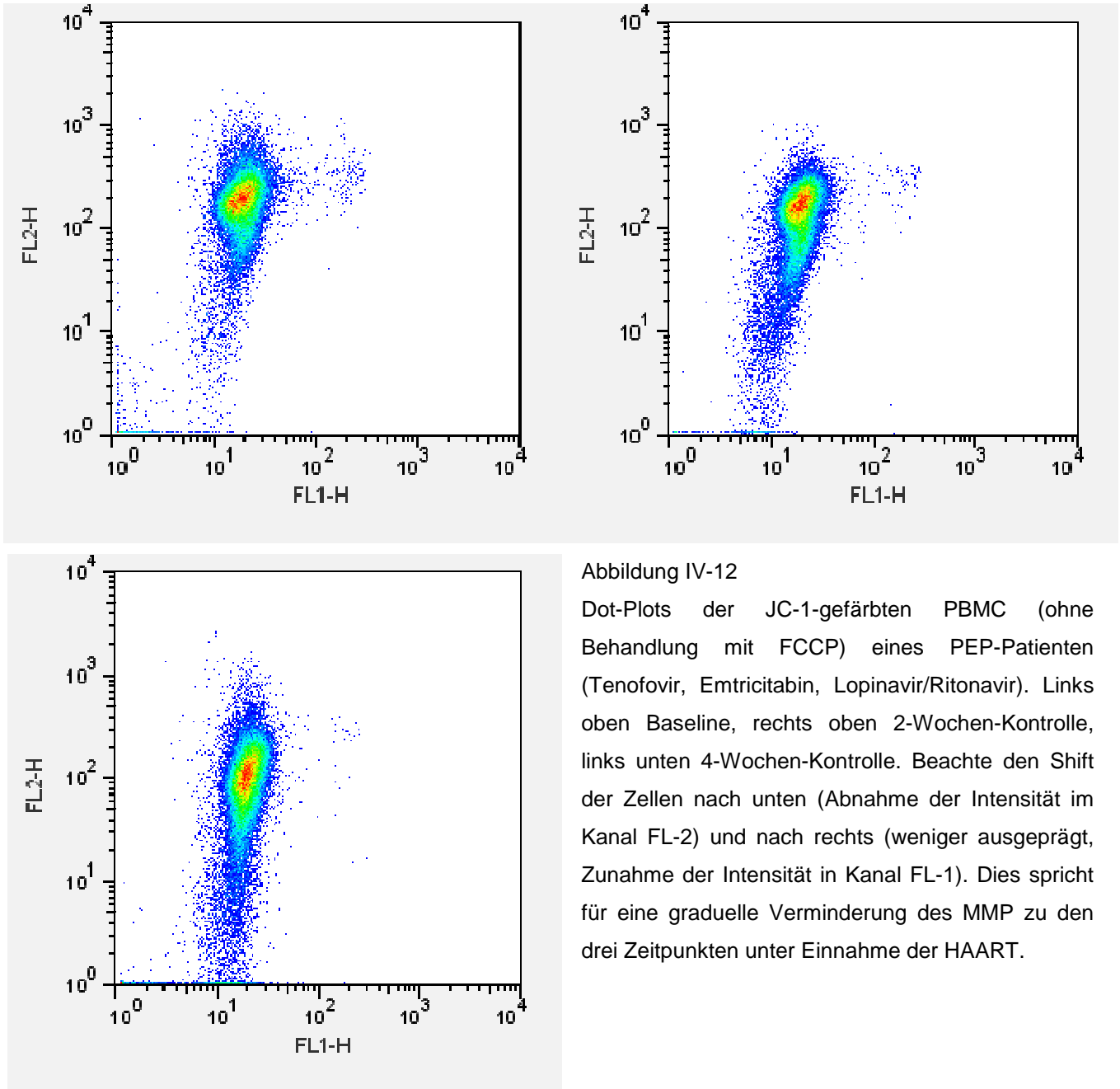
Tabelle IV-N Teil 2 Laborwerte der PEP-Kollektive. † =Außerhalb des Normbereiches

Parameter	Baseline $\Delta\Psi m$	2-Wochen- Kontrolle $\Delta\Psi m$	4-Wochen- Kontrolle $\Delta\Psi m$	3-Monats- Kontrolle $\Delta\Psi m$	Baseline Apoptoserate	2-Wochen- Kontrolle Apoptose- rate	4-Wochen- Kontrolle Apoptoserate	3-Monats- Kontrolle Apoptose- rate
Erythrozyten [Millionen/ μl]	4,89 (4,20; 5,44)	4,81 (4,10; 5,36)	4,74 (4,10; 5,26)	4,71 (3,88; 5,18)	4,88 (4,27; 5,44)	4,795 (4,100; 5,360)	4,73 (4,10; 5,26)	4,795 (3,880; 5,180)
Thrombozyten [1000x/ μl]	250 (220; 368)	270 (97 \dagger ; 351)	238 (122; 321)	220 (131; 317)	301 (220; 368)	270 (97 \dagger ; 351)	255,5 (122,0; 321,0)	222 (131; 317)
Leukozyten [1000x/ μl]	7,65 (6,20; 10,70)	5,8 (4,3; 8,2)	6,3 (3,9; 11,8)	7,1 (6,7; 7,9)	7,9 (6,5; 10,7)	6,0 (4,3; 8,2)	6,5 (3,9; 11,8)	7,3 (6,7; 7,9)
Hb [g/dl]	14,75 (13,50; 16,50)	14,7 (12,3; 16,6)	14,4 (13,1; 16,6)	14,7 (12,3; 16,2)	14,9 (13,5; 16,5)	15,0 (12,3; 16,6)	14,5 (13,1; 16,6)	14,95 (12,30; 16,20)
Hkt [%]	42,65 (38,80; 48,20)	43,0 (36,4; 48,1)	42,4 (37,9; 47,7)	42,5 (36,3; 47,6)	43,9 (39,5; 48,2)	43,65 (36,40; 48,10)	42,7 (37,9; 47,7)	43,5 (36,3; 47,6)
MCV [fl]	89,45 (84,90; 98,30)	89,3 (85,7; 97,8)	90,35 (85,10; 99,30)	91,3 (85,2; 94,5)	90,2 (86,6; 98,3)	89,5 (86,6; 97,8)	90,95 (87,30; 99,30)	91,6 (85,2; 94,5)
MCH [pg]	30,9 (29,0; 33,3)	30,45 (27,90; 33,20)	30,65 (28,1; 33,9)	30,8 (29,0; 32,5)	31,2 (29,7; 33,3)	30,55 (29,80; 33,20)	30,9 (29,6; 33,9)	30,7 (29,0; 32,5)
MCHC [g/dl]	34,3 (33,9; 35,3)	34,1 (32,6; 35,3)	34,1 (33,0; 34,8)	34,1 (32,9; 35,1)	34,2 (33,9; 34,6)	34,2 (33,1; 35,3)	34,1 (33,1; 34,8)	34,05 (32,90; 34,60)
Segmentierte [%]	63,5 (49,0; 71,0)	55,5 (43,0; 74,0)	57,5 (28,0; 82,0)	57 (44; 72)	66 (54; 71)	55,5 (43,0; 74,0)	53 (28; 82)	60 (44; 72)
Eosinophile [%]	1,5 (0,0; 6,0)	2 (0; 8)	2 (0; 11 \dagger)	1 (1; 3)	1 (0; 6)	2 (1; 8)	2 (0; 11 \dagger)	1 (1; 3)
Basophile [%]	0 (0; 2)	1 (0; 1)	0 (0; 1)	0 (0; 0)	0 (0; 2)	1 (0; 1)	1 (0; 1)	0 (0; 0)
Lymphozyten [%]	26,5 (21,0; 39,0)	34,5 (15,0; 50,0)	31,5 (10,0 \dagger ; 67,0)	32 (17; 46)	25 (21; 35)	34,5 (15,0; 50,0)	36 (10 \dagger ; 67)	30,5 (17,0; 46,0)
Monozyten [%]	7 (5; 9)	8 (4; 10)	7 (4; 10)	8 (5; 9)	7 (5; 9)	8 (4; 10)	6,5 (4,0; 10,0)	7,5 (5,0; 9,0)

Tabelle IV-O Teil 3 Differentialblutbild der PEP-Kollektive. † =Außerhalb des Normbereiches

IV.8 Vergleichende Teste PEP-Kollektive

IV.8.1 Beispielhafte Dot-Plots der JC-1-gefärbten PBMC



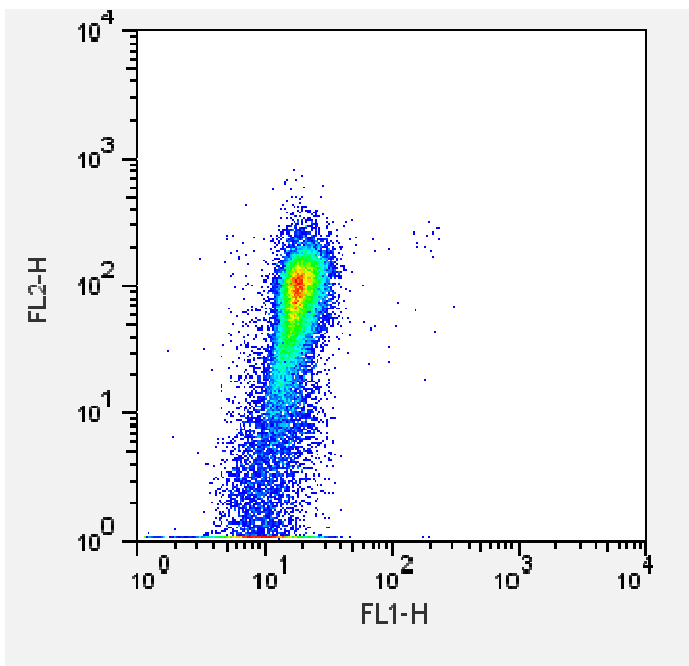


Abbildung IV-13

Dot-Plot der JC-1-gefärbten PBMC des PEP-Patienten, der eine Kombination aus Lamivudin, Zidovudin und Lopinavir/Ritonavir einnahm, 4-Wochen-Kontrolle. Hier war der Shift nach unten (Intensitätsabnahme im Kanal FL-2) besonders deutlich, was auf ein sehr niedriges MMP und somit auf die stark mitochondrientoxische Wirkung des Zidovudin hinweist.

IV.8.2 Auswertung der mitochondrialen Membranpotentiale bei den HIV-PEP-Kollektiven

Die MMPs nahmen beim PEP-Kollektiv von der Baseline zur 4-Wochen-Kontrolle ab. Diese Abnahme war in der SAS[®] PROC MIXED Analyse statistisch hoch signifikant (s. Tabelle IV-N und Abbildungen IV-14 und IV-15).

	Baseline	2-Wochen-Kontrolle	4-Wochen-Kontrolle	Normalkollektiv
Anzahl Werte	10	18	16	9
Median	9,34	8,25	7,48	10,93
Minimum	6,49	5,50	4,65	5,63
Maximum	12,54	11,34	10,07	14,10
Durchgeführter Test	Moxed model Analyse mit autoregressiver Covarianzmatrix			
p-Wert für linearen Term für Tage unter PEP von Baseline bis 4-Wochen-Kontrolle	0.0016			
p-Wert für quadratischen Term für Tage unter PEP von Baseline bis 4-Wochen-Kontrolle	0.0195			

Tabelle IV-P Verlauf MMP bei PEP von Baseline bis 4-Wochen-Kontrolle

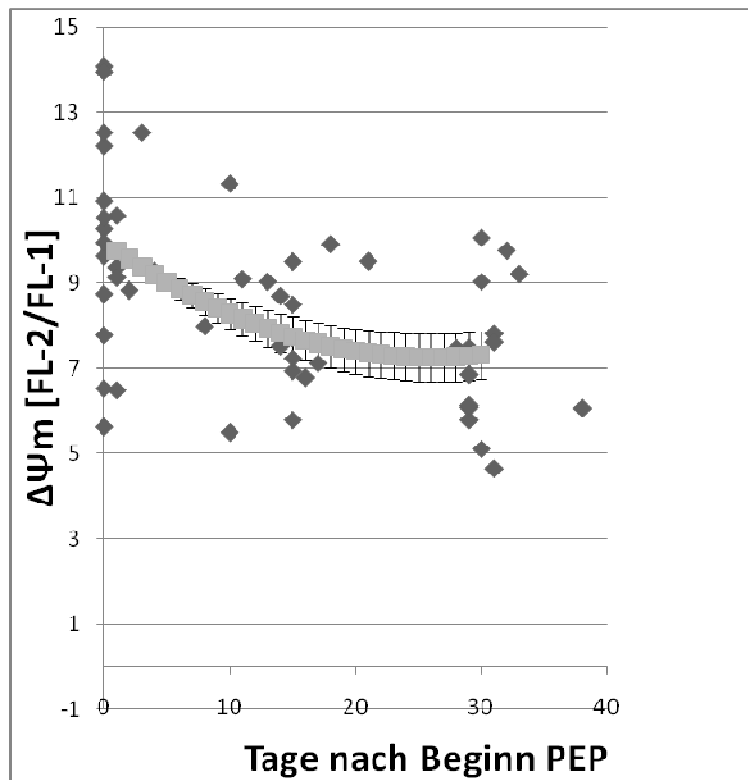


Abbildung IV-14 Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials über die Zeit während der PEP-Einnahme. Gezeigt sind die einzelnen Messungen zu den exakten Zeitpunkten in Tagen und der durch die Mixed Model Analyse vorhergesagte Abfall des Medianen MMP inkl. 95%-Konfidenzintervalle.

Von der 4-Wochen-Kontrolle zur 3-Monats-Kontrolle stiegen die MMPs beim PEP-Kollektiv wieder an. Dieser Anstieg war in der mixed model Analyse statistisch signifikant ($p=0.0227$) (s. Tabelle IV-O und Abbildung IV-15).

	4-Wochen-Kontrolle	3-Monats-Kontrolle
Anzahl Werte	16	8
Median	7,48	9,21
Minimum	4,65	7,68
Maximum	10,07	11,45
Durchgeführter Test	Moxed model Analyse mit unstructured Covarianzmatrix	
p-Wert für die Signifikanz des Terms Zeitpunkt im Modell	0.0227	
Unterschied statistisch signifikant ($p<0,05$)	Ja	

Tabelle IV-Q Vergleich MMP bei PEP zwischen 4-Wochen-Kontrolle und 3-Monats-Kontrolle

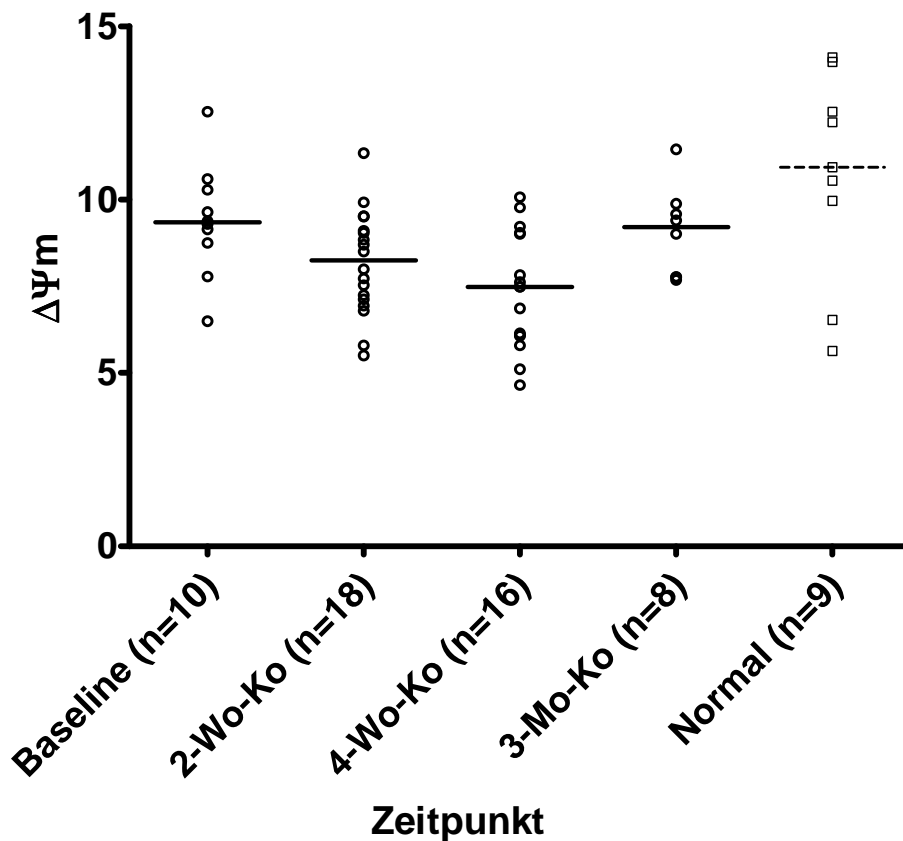


Abbildung IV-15

Vergleich der MMPs zwischen den einzelnen Messzeitpunkten und mit dem gematchten Normalkollektiv, stark vereinfachte Darstellung der Zeitpunkte zur Veranschaulichung. Zu beachten in dieser Darstellung vor allem der Wiederanstieg des MMP nach Beendigung der PEP. Angegeben sind Mediane und die einzelnen Messwerte. Es konnten nicht alle Patienten zu allen Zeitpunkten erfasst werden.

Das Gesamtcholesterin korrelierte statistisch mit dem MMP sowohl bei der Baselinemessung ($p=0,0025^{**}$, lineare Regression: $p= 0,0114^*$), als auch in der 2-Wochen-Kontrolle ($p= 0,0040^{**}$, lineare Regression: $p= 0,0394^*$). Zusätzlich ergaben sich bei der 2-Wochen-Kontrolle Korrelationen zwischen dem MMP und der LDL ($p= 0,0107^*$, lineare Regression: $p= 0,0130^*$) bzw. der GOT ($p= 0,0058^{**}$, lineare Regression: $p= 0,0116^*$). Diese konnten allerdings bei den darauffolgenden Kontrollen nicht festgestellt werden. Alle Korrelationen wurden mittels des Spearman-Korrelationskoeffizienten berechnet.

IV.8.3 Auswertung der Apoptoseraten des HIV-PEP-Kollektivs

Die Apoptoseraten änderten sich unter der PEP-Einnahme nicht und unterschieden sich nicht von denen des Normalkollektivs ($p=0.3438$) (s. Tabelle IV-P und Abbildung IV-16).

	Baseline	2-Wochen-Kontrolle	4-Wochen-Kontrolle	3-Monats-Kontrolle	Normalkollektiv
Anzahl Werte	5	14	10	7	9
Median [%]	3,83	4,47	3,68	4,44	3,93
Minimum [%]	2,47	1,81	2,19	2,91	3,09
Maximum [%]	5,98	10,63	5,98	9,18	7,83
Durchgeführter Test	Moxed model Analyse mit autoregressiver Covarianzmatrix				
p-Wert für Tage unter PEP von Baseline bis 4-Wochen-Kontrolle	0.3438				
Unterschied statistisch signifikant ($p<0,05$)	Nein				

Tabelle IV-R Verlauf Apoptoseraten bei PEP von Baseline bis 3-Monats-Kontrolle

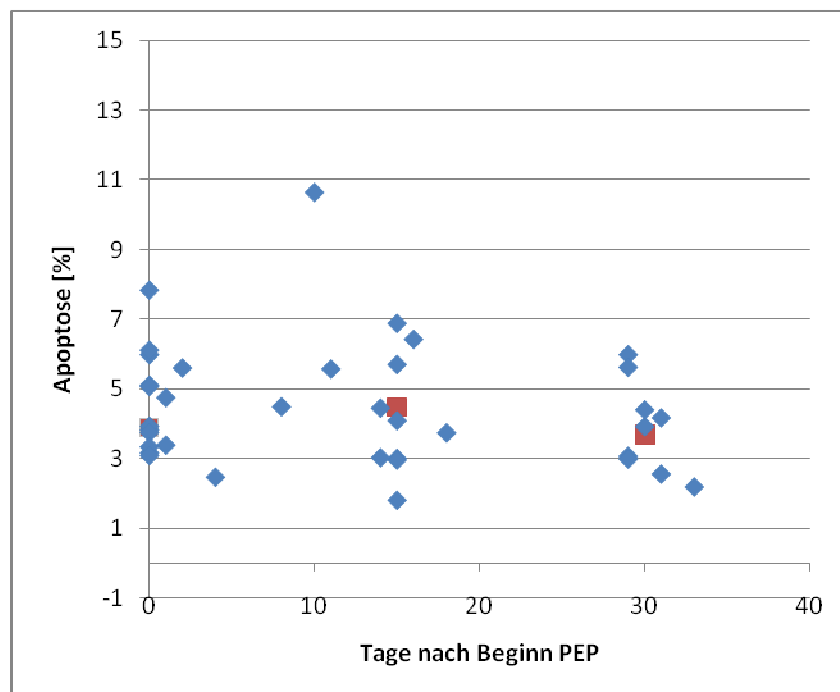


Abbildung IV-16 Vergleich der Apoptoseraten zwischen den einzelnen Messzeitpunkten. Angegeben sind Mediane und die einzelnen Messwerte

IV.8.4 Subkohorte des HIV-PEP-Kollektivs, die Emtricitabin, Tenofovir und Lopinavir/Ritonavir erhielt

Bei alleiniger Betrachtung der Patienten, die eine Kombination aus Emtricitabin, Tenofovir und Lopinavir/Ritonavir erhielten, zeigte sich ebenfalls eine signifikante Abnahme des MMP (ausgewertet als Quotient FL-2/FL-1) von der Baseline zur 4-Wochen-Kontrolle (s. Tabelle IV-Q) und ein statistischer Trend der Zunahme von der 4-Wochen-Kontrolle bis zur 3-Monats-Kontrolle ($p=0.0935$) (s. Tabelle IV-R). Analog kam es zu einer signifikanten Zunahme des Prozentualen Anteils von Zellen mit erniedrigtem MMP von der Baseline bis zur 4-Wochen-Kontrolle (s. Tabelle IV-S und Abbildung IV-17) und zu einer ebenfalls signifikanten Abnahme des Anteils dieser Zellen von der 4-Wochen-Kontrolle bis zur 3-Monats-Kontrolle ($p=0,047$) (mixed model Analysen, s. Tabelle IV-T und Abbildung IV-17).

	Baseline	2-Wochen-Kontrolle	4-Wochen-Kontrolle	Normalkollektiv
Anzahl Werte	9	16	14	9
Median	9,38	7,86	7,55	10,93
Minimum	6,49	5,50	5,79	5,63
Maximum	12,54	9,92	10,07	14,10
Durchgeführter Test	Mixed model Analyse mit autoregressiver Covarianzmatrix			
Durch das Modell geschätzter Koeffizient für den Einfluss des linearen Terms pro Tag unter PEP auf die Abnahme des MMP im Regressionsmodell mit Standardfehler von Baseline bis Woche 4	-0.1786 (0.04820)			
p-Wert für linearen Term für Tage unter PEP von Baseline bis 4-Wochen-Kontrolle	0.0015			
Durch das Modell geschätzter Koeffizient für den Einfluss des quadratischen Terms pro Tag unter PEP auf die Abnahme des MMP im Regressionsmodell mit Standardfehler von Baseline bis Woche 4	0.003717 (0.001132)			
p-Wert für quadratischen Term für Tage unter PEP von Baseline bis 4-Wochen-Kontrolle	0.0039			

Tabelle IV-S Verlauf MMP bei PEP Truvada[®]/Kaletra[®] von Baseline bis 4-Wochen-Kontrolle

	4-Wochen-Kontrolle	3-Monats-Kontrolle
Anzahl Werte	14	7
Median	7,55	9,01
Minimum	5,79	7,68
Maximum	10,07	9,88
Durchgeführter Test	Mixed model Analyse mit unstructured Covarianzmatrix	
p-Wert für die Signifikanz des Terms Zeitpunkt im Modell	0.0935	
Unterschied statistisch signifikant ($p < 0,05$)	Nein	

Tabelle IV-T Vergleich MMP bei PEP Truvada®/Kaletra® zwischen 4-Wochen-Kontrolle und 3-Monats-Kontrolle

	Baseline	2-Wochen-Kontrolle	4-Wochen-Kontrolle	Normalkollektiv
Anzahl Werte	9	16	14	9
Median	20,52	25,40	26,94	14,11
Minimum	13,18	10,10	15,62	10,46
Maximum	39,19	49,34	62,07	26,81
Durchgeführter Test	Mixed model Analyse mit autoregressiver Covarianzmatrix			
p-Wert für linearen Term für Tage unter PEP von Baseline bis 4-Wochen-Kontrolle	0,0009			
p-Wert für quadratischen Term für Tage unter PEP von Baseline bis 4-Wochen-Kontrolle	0,018			

Tabelle IV-U Verlauf Prozent Zellen mit erniedrigtem MMP bei PEP Truvada®/Kaletra® von Baseline bis 4-Wochen-Kontrolle

	4-Wochen-Kontrolle	3-Monats-Kontrolle
Anzahl Werte	14	7
Median	26,94	22,65
Minimum	15,62	13,49
Maximum	62,07	28,08
Durchgeführter Test	Mixed model Analyse mit unstructured Covarianzmatrix	
p-Wert für die Signifikanz des Terms Zeitpunkt im Modell	0,047	
Unterschied Statistisch signifikant ($p < 0,05$)	Ja	

Tabelle IV-V Vergleich Prozent Zellen mit erniedrigtem MMP bei PEP Truvada®/Kaletra® zwischen 4-Wochen-Kontrolle und 3-Monats-Kontrolle

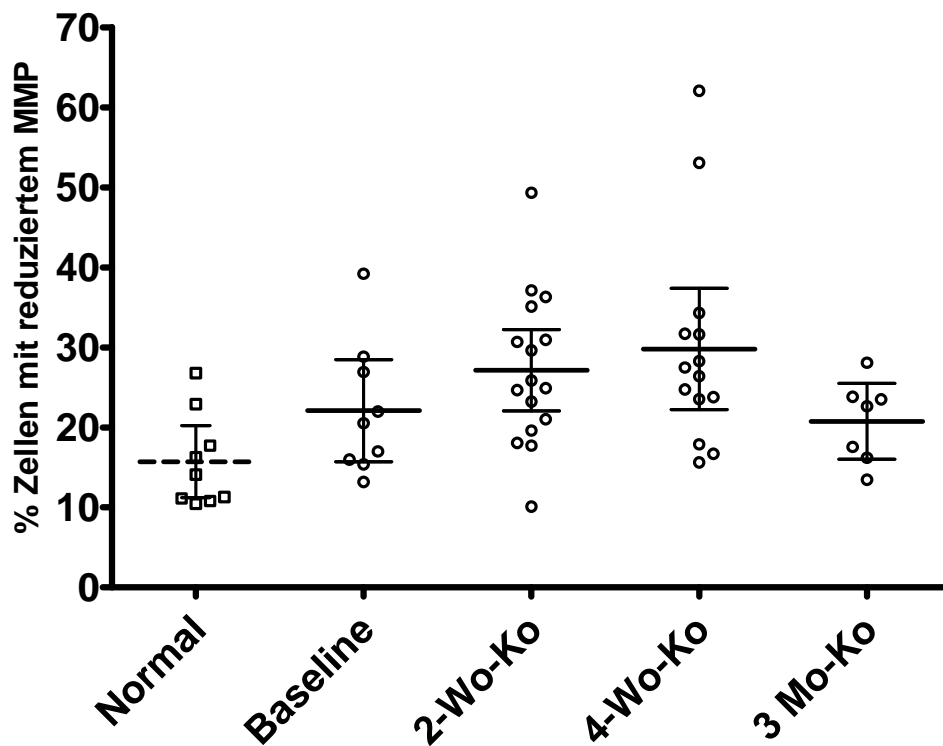


Abbildung IV-17

Zunahme des prozentualen Anteils von Zellen mit vermindertem MMP während der PEP-Einnahme und erneute Abnahme des Anteils dieser Zellen nach Absetzen der PEP. Angegeben sind Mediane, 95%-Konfidenzintervalle und die einzelnen Messungen.

Die Apoptoserate änderte sich bei Betrachtung der PEP-Patienten, die Emtricitabin, Tenofovir und Lopinavir/Ritonavir einnahmen, wie bei Betrachtung aller PEP-Patienten, nicht ($p=0.4234$) (Mixed model Analyse, s. Tabelle IV-U).

	Baseline	2-Wochen-Kontrolle	4-Wochen-Kontrolle	3-Monats-Kontrolle	Normalkollektiv
Anzahl Werte	5	13	9	6	9
Median [%]	3,83	4,45	3,44	4,88	3,93
Minimum [%]	2,47	1,81	2,19	2,91	3,09
Maximum [%]	5,98	10,63	5,98	9,18	7,83
Durchgeführter Test	Mixed model Analyse mit autoregressiver Kovarianzmatrix				
p-Wert für zeitlichen Verlauf von Baseline bis 4-Wochen-Kontrolle in Tagen unter PEP	0.4234				
Unterschied statistisch signifikant ($p<0,05$)	Nein				

Tabelle IV-W Verlauf Apoptoseraten bei PEP Truvada®/Kaletra® von Baseline bis 3-Monats-Kontrolle

V Diskussion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine 4-wöchige Einnahme von zwei neueren NRTI (Tenofovir und Emtricitabin) in Kombination mit dem PI Lopinavir/Ritonavir bei gesunden Personen zu einer Verminderung des MMP in PBMC führt, was zwei Monate nach Absetzen der Medikamente nicht mehr zu beobachten war. Außerdem waren bei einem Kollektiv chronisch Hepatitis C-Infizierter die MMPs in PBMC statistisch signifikant niedriger, als bei einem Kollektiv gesunder. Bei den HCV-Patienten mit Therapie waren die MMPs im statistischen Trend niedriger als bei untherapierten HCV-Patienten und ebenfalls im statistischen Trend niedriger als beim Normalkollektiv. Sowohl die chronische Infektion mit dem Hepatitis B-Virus als auch die Therapie dieser Virusinfektion schienen keinen Einfluss auf das MMP in PBMC gehabt zu haben. Die Apoptoseraten waren bei allen untersuchten Kollektiven statistisch nicht signifikant unterschiedlich von den Vergleichskollektiven.

Diese Untersuchungen wurden im Rahmen einer Arbeit durchgeführt, da es sich sowohl bei HIV als auch bei chronischer Hepatitis B bzw. C um chronische Virusinfektionen handelt und die Wirkung der Hepatitisviren auf das MMP an Patienten noch nicht untersucht wurde. Zum anderen wird ein Teil der Medikamente, die bei HIV-Infektion eingesetzt werden und potentiell mitochondrientoxisch sind auch bei der Therapie der chronischen Hepatitis B verwendet (Honkoop *et al.*, 1997, Birkus *et al.*, 2002, Mazzucco *et al.*, 2008), so dass auch hier die Untersuchung des Einflusses dieser Substanzen auf das MMP als Monotherapie und ohne den Einfluss des HIV von Interesse ist. Tenofovir und Lamivudin sind z. B. zwei Nucleosidanaloga, die sowohl bei der HIV-PEP, der HIV-Therapie als auch bei der HBV-Therapie eingesetzt werden. Emtricitabin ist ebenfalls bei der HBV-Infektion wirksam, auch in Kombination mit Tenofovir (Berg *et al.*, 2010). Diese Kombination wurde bei 19 der 20 untersuchten HIV-PEP Patienten in dieser Arbeit eingesetzt. Bei der Therapie der chronischen Hepatitis C Infektion wird das Nucleosidanalogon Ribavirin in Kombination mit Interferon- α verwendet. Auch hier gab es bereits Hinweise, dass die mitochondriale Funktion durch diese Substanzen negativ beeinflusst wird (de Mendoza *et al.*, 2005). Allerdings wurde dies nicht in allen Untersuchungen bestätigt, so dass die Ergebnisse diesbezüglich widersprüchlich sind (Ballesteros *et al.*, 2004).

V.1 Mitochondriales Membranpotential und Apoptoserate der PBMC beim HBV-Kollektiv im Vergleich zum Normalkollektiv

Es ergab sich bei dieser Untersuchung kein relevanter Unterschied sowohl zwischen den MMPs in PBMC als auch bei der Apoptoserate der PBMC bei HBV-Patienten im Vergleich zu Normalprobanden.

Im Labor waren alle Werte im Median unauffällig. 2 Patienten zeigten erhöhte GOT-Werte bis 84 U/l, die GPT war bei 5 Patienten bis 194 U/l erhöht, 3 zeigten eine Bilirubinerhöhung mit Werten bis 4,7 mg/dl, insgesamt am ehesten als Ausdruck des im Rahmen der Infektion aufgetretenen Leberschadens zu werten, 3 wiesen eine erhöhte gesamt-CK bis 257 U/l und ebenfalls 3 Patienten eine Erhöhung der TAG mit Werten bis 367 mg/dl auf. Kein Laborparameter korrelierte mit dem MMP bzw. der Apoptoserate.

Eine Literaturrecherche zeigte keine Voruntersuchungen auf, in denen der Einfluss des HBV-Virus auf das MMP von PBMC bei Patienten untersucht wurde, aber es wurden bereits zahlreiche Untersuchungen zum Thema Hepatitis-B-Virus und mitochondriale Dysfunktion an Zellkulturen durchgeführt.

HBV Protein X scheint in x-Gen transfizierten HuH7 und HepG2 Zellkulturen zu einer Aggregation von Mitochondrien um den Zellkern herum zu führen. Außerdem zeigten die transfizierten Zellen im TUNEL-Assay positiv gefärbte Zellkerne, Membranblebbing, eine Verminderung des mitochondrialen Membranpotentials (JC-1) und Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien. All diese Veränderungen sind typisch für den Vorgang der Apoptose. Auch wurden diese Beobachtungen unabhängig von der Expression des Tumorsuppressorgens p53 gemacht, so dass die Apoptoseinduktion durch HBx unabhängig von diesem Faktor induziert werden muss (Takada *et al.*, 1999). Das X Protein scheint sich in diesen Zellen über einen spannungsabhängigen Anionenkanal, HVDAC3, an die Mitochondrien anzulagern und dadurch das mitochondriale Membranpotential zu ändern. Eine Cytochrom c Freisetzung aus den Mitochondrien wurde in dieser Studie nicht beobachtet. Unter den HBx-exprimierenden Zellen gab es ca. 25 bis 30% Zellen, die ein vermindertes mitochondriales Membranpotential besaßen, während es bei Kontrollen nur ca. 5 bis 10% waren

(Rahmani *et al.*, 2000). Auch in einer anderen Untersuchung an HBx-transfizierten Zellen waren die Apoptoserate erhöht und das mitochondriale Membranpotential (unter anderem mittels JC-1 untersucht) erniedrigt (Shirakata & Koike, 2003). HBx verursachte in transfizierten HepG2 Zellkulturen eine Herunterregulierung und Verminderung der Aktivität der Atmungskettenkomplexe I, III, IV und V. Es scheint diese Zellen empfindlicher für apoptotische Stimuli zu machen. HBx-transfizierte Zellen wiesen schon bei niedrigeren Vitamin K3 Konzentrationen eine Abnahme des MMP auf, als nicht transfizierte Zellen. Diese Untersuchungen implizieren, dass HBx die Aktivität der Atmungskettenkomplexe vermindert, was zu einer Verminderung des Elektronenflusses durch die Atmungskette führt (Lee *et al.*, 2004). In anderen Untersuchungen wurde ebenfalls der Einfluss von HBx auf apoptotische Signalwege untersucht und dabei sowohl ein Einfluss auf proapoptotische als auch antiapoptotische Signalwege gefunden. Laut anderer Studien hat HBx doch vermutlich einen Einfluss auf den mtPTP und die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien und somit auf die Aktivierung von Caspasen. Diese Veränderungen würden zur Apoptose der Zellen führen (Takada *et al.*, 1999, Rahmani *et al.*, 2000, Shirakata & Koike, 2003, Lee & Molinaro, 2003). Diesbezüglich sind die Studienergebnisse, wie aus den oben vorgestellten Studien gezeigt, jedoch sehr widersprüchlich.

In der hier diskutierten Arbeit konnte kein Einfluss von HBV auf das MMP bzw. die Apoptoserate von PBMC nachgewiesen werden, was sich mit den Ergebnissen der Arbeiten an HBx-transfizierten Zellkulturen widerspricht, in denen teilweise ein negativer Einfluss von HBx auf die mitochondriale Struktur und Funktion nachgewiesen wurde. Dies könnte jedoch auch am untersuchten Zelltyp (PBMC) liegen. Deshalb muss man sich im Hinblick auf die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen die Frage stellen, ob PBMC ein für die Fragestellung geeignetes Untersuchungsmedium darstellen und dieser Zelltyp mit HBV infiziert ist.

Der Vorteil der Untersuchung von PBMC besteht darin, dass sie beim Patienten durch eine einfache Blutentnahme leicht zu erhalten und im Labor relativ einfach zu isolieren sind.

Außerdem sind PBMC ein klassischer Zelltyp, in dem der Einfluss der antiviralen Medikamente, die bei der HIV-Infektion sowie auch teilweise bei der Hepatitis B-Therapie eingesetzt werden, auf die Mitochondrien und die Apoptoserate schon vielfach untersucht wurde (Sternfeld *et al.*, 2007, Sternfeld *et al.*, 2009). NRTI müssen in den durch HIV infizierten Lymphozyten Wirkungen entfalten und sind somit

lymphozytengängig. Bei der HBV-Therapie werden einige der auch bei HIV wirksamen Nucleosidanaloga eingesetzt und insofern eignen sich Lymphozyten, um die mitochondrientoxischen Wirkungen der HBV-Therapie zu untersuchen.

Das Vorkommen von Hepatitis B Viren in PBMC wurde schon lange untersucht. Es gibt viele Publikationen, in denen der Nachweis von HBV-DNA in PBMC gelungen war (Lienjo *et al.*, 1983, Ding & Oon, 1984, Pontisso *et al.*, 1984, Yoffe *et al.*, 1986). Auch andere extrahepatische Infektionsorte wurden bereits diskutiert, wie zum Beispiel die Milz (Lieberman *et al.*, 1987), Zellen des Knochenmarks (Romet-Lemonne *et al.*, 1983a), Zellen des Gallengangssystems und glatte Muskelzellen in der Leber (Blum *et al.*, 1983).

Da die HBV-DNA in PBMC und die Expression von HBsAg bzw. HBcAg auf der PBMC-Oberfläche in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurde, muss man bezüglich der Infektion von PBMC durch das HBV auf folgende Studienergebnisse zurückgreifen:

Unter 34 asymptomatischen Trägern, die HBeAg positiv waren, war in einer Untersuchung bei 85% HBV-DNA in PBMC nachweisbar. Unter 42 HBeAg negativen wies keiner HBV-DNA positive PBMC auf. 75% aller HBeAg positiven Erkrankten hatten HBV-DNA positive PBMC wohingegen nur bei 10% der seronegativen Erkrankten HBV-DNA in den PBMC gefunden wurde. Allerdings war nur bei einem aller 62 Patienten mit HBV-DNA in ihren PBMC das virale Genom in die zelluläre DNA integriert, während bei den restlichen 61 das Virusgenom frei in den Zellen vorlag. Bei 8 Patienten wurden DNA-Stränge gefunden, die von der Länge her Zwischenprodukte des Replikationsvorgangs darstellen könnten, und diese Patienten zeigten klinisch alle aktive Hepatitiden. Bei keiner der 172 Kontrollpersonen war HBV-DNA in den PBMC nachweisbar (Sugai & Okamoto, 1989). Bei vielen Patienten, bei denen HBV-DNA in PBMC nachweisbar war, war auch HBV-DNA im Serum nachweisbar, so dass es wie beim Vorkommen von HCV-RNA in PBMC diskutiert (siehe Kapitel V.3) auch um Adhäsion der Viren an die Zellen handeln könnte und gar nicht um eine echte extrahepatische Infektion. Gegen die Adhäsionstheorie spricht allerdings, dass in einigen Arbeiten das Vorkommen von Nucleinsäureintermediaten der Replikation gefunden wurde (Sugai & Okamoto, 1989). Des Weiteren wurde in dieser Studie keine Korrelation zwischen HBV-DNA im Serum und in den PBMC gefunden. Darüber hinaus haben andere Arbeitsgruppen HBeAg und HBsAg in den HBV-DNA positiven Zellen gefunden, so dass man spekulieren kann, dass auch die Translation der HBV-Gene in PBMC stattfinden könnte (Romet-Lemonne *et al.*, 1983b). Betroffene PBMC sollen im

Schnitt 1 bis 3 Kopien pro Zelle enthalten, wohingegen Hepatozyten im Schnitt ca. 1000 Kopien pro Zelle enthalten (Sugai & Okamoto, 1989). Demnach scheinen PBMC zwar infiziert, jedoch in viel geringerem Ausmaß, als Hepatozyten. Dies könnte eine Erklärung sein, warum in der hier diskutierten Arbeit kein niedrigeres MMP in PBMC HBV-Infizierter gefunden werden konnte. In einer anderen Untersuchung wiesen alle der fünfunddreißig untersuchten Patienten mit chronisch aktiver Hepatitis B HBsAg auf der PBMC-Oberfläche auf. Bei den Kontrollen konnte dies nicht festgestellt werden (Roisman *et al.*, 1994). Ein Drittel der HBV-infizierten untersuchten Patienten zeigte auch HBcAg auf der PBMC- Zelloberfläche. Hier gab es eine positive Korrelation bei Patienten mit chronischer Erkrankung, die im Serum HBeAg positiv waren. Alle PBMC, in denen HBcAg nachweisbar war, waren ebenfalls HBsAg positiv. Unter einer Interferontherapie bei den chronisch erkrankten Patienten verschwand das HBsAg der PBMC. Die Ergebnisse könnten auf stattfindende Translation in diesen Zellen hinweisen, allerdings könnte die Assoziation von HBV Antigenen mit PBMC auch durch eine Bindung der Viren an die Membran dieser Zellen zustande kommen. Das HBsAg wurde vor allem auf B-Lymphozyten detektiert. Das Vorkommen des Virus in Lymphozyten könnte eine Erklärung für die Dysfunktionen des Immunsystems sein, die bei der HBV-Infektion beobachtet werden können (Roisman *et al.*, 1994). Eine Relevanz der Untersuchung der HBV-Wirkung auf PBMC könnte demnach darin bestehen, dass die Entzündung der Leber bei der Infektion durch das eigene Immunsystem im Sinne einer Virusabwehr ausgelöst wird (Bertoletti *et al.*, 2010). Das Virus könnte durch die Infektion der PBMC versuchen, diese Immunreaktion zu unterdrücken, um die ungestörte Replikation in Hepatozyten zu ermöglichen. Ein Nachweis eines erniedrigten mitochondrialen Membranpotentials in infizierten PBMC würde diese Theorie stützen. Allerdings konnte dieser Effekt in der hier diskutierten Arbeit nicht nachgewiesen werden.

In einer Untersuchung an lediglich 3 Patienten mit chronischer Hepatitis B Infektion (alle HBsAg-, HBeAg- und HBV-DNA-positiv, Viruslasten über 10^9 Kopien/ml, keine aktive Entzündungsreaktion in Leberbiopsien, Transaminasen im Normbereich) wurde bei allen untersuchten Patienten mittels quantitativer RT/PCR HBV-spezifische mRNA in den PBMC nachgewiesen, welche die Viren aus dem Plasma nicht zeigten. Bei den meisten gefundenen mRNAs handelte es sich um die mRNA des X-Proteins, außerdem detektiert wurden mRNAs, die andere große und kleine virale Oberflächenproteine codieren. CccDNA wurde ebenfalls nachgewiesen, was beides starke Indizien für eine

Virusreplikation in PBMC sind (Stoll-Becker *et al.*, 1997). Da HBx für die mitochondriale Dysfunktion an HBV-infizierten Zellkulturen verantwortlich gemacht wurde (Takada *et al.*, 1999, Rahmani *et al.*, 2000, Shirakata & Koike, 2003, Lee *et al.*, 2004), würde dessen Synthese bzw. Vorkommen in PBMC für eine potentiell mögliche Schädigung der Mitochondrien durch HBV auch in diesem Zelltyp sprechen.

In diesem Fall wären PBMC durchaus als Untersuchungsmedium geeignet. Allerdings bleibt offen, ob man einen relevanten Unterschied zum Normalkollektiv gefunden hätte, wenn alle Patienten PBMC aufweisen würden, die mit dem HBV-Virus infiziert sind und wenn die PBMC zu 100% mit dem HBV-Virus infiziert wären.

Insgesamt gibt es aber doch klare Hinweise, dass zumindest ein Teil der PBMC durch HBV infiziert wird, somit scheinen sie ein geeignetes Medium zu sein, um mitochondrientoxische Wirkungen durch das HB-Virus zu untersuchen. Es stellt sich ebenso die Frage, ob an einem größeren Kollektiv untherapierter HBV-Patienten eventuell vorhandene geringe Einflüsse und Unterschiede zu detektieren gewesen wären. Möglicherweise war die statistische Power in der vorliegenden Studie durch die geringe Fallzahl des Hepatitis B-Kollektivs nicht groß genug.

V.2 Vergleich der MMPs und der Apoptoseraten bei therapierten und untherapierten Patienten des HBV-Kollektivs

Bei den Medikamenten, welche die Patienten unter Therapie bekamen, handelte es sich um neuere Nucleosidanaloga (Lamivudin, Adefovir, Tenofovir, Entecavir) und ein Patient bekam Peg-IFN α . Die Patienten wurden nicht einheitlich mit einem bestimmten Regime behandelt, so dass in der Auswertung diese unterschiedlichen Substanzen alle in einem Unterkollektiv zusammengefasst wurden. Durch die geringe Fallzahl und andererseits diese gemeinsame Auswertung sämtlicher eingesetzter Substanzen ist keine sichere Aussage bezüglich der Wirkung der einzelnen Substanzen auf das MMP möglich. In dieser Auswertung ergaben sich keine Unterschiede beim MMP oder bei der Apoptoserate zwischen dem therapierten und dem untherapierten HBV-Kollektiv. Im Vergleich der Apoptoseraten bei den therapierten HBV-Patienten mit den nicht-Therapierten konnte sich ein Trend hinsichtlich einer niedrigeren Apoptoserate unter Therapie nachweisen lassen. Allerdings war die Apoptoserate bei den Untherapierten

nicht viel höher als bei dem Normalkollektiv, so dass bei diesem Trend keine abschließende Aussage getroffen werden kann.

Lamivudin ist nach wie vor eine Standardsubstanz für die Behandlung der chronischen HBV-Infektion. Es gibt andere Untersuchungen, die ebenfalls keine mitochondriale Toxizität von Lamivudin feststellen konnten. Zum Beispiel verursacht Lamivudin kaum klinische Nebenwirkungen, die mit mitochondrialer Dysfunktion assoziiert sind (Anderson & Rower, 2010). Auf die Funktion und Morphologie der Mitochondrien von Hepatozyten konnte durch Lamivudin kein negativer Einfluss gefunden werden, die Aktivität der durch mtDNA codierten Enzyme besserte sich sogar unter Lamivudintherapie gegenüber dem Ausgangszustand bei untherapierten HBV-Patienten (Honkoop *et al.*, 1997). Ebenso ging die Serumkonzentration von sFas und sFasL unter Lamivudintherapie zurück (Lapinski *et al.*, 2004). Jedoch ist die Anzahl untersuchter Patienten, die Lamivudin bekamen, in der hier diskutierten Studie mit zwei zu gering für eine Aussage und außerdem sind diese beiden Patienten zusammen mit Patienten, die andere Nucleosidanaloga einnahmen, ausgewertet worden.

Der Einfluss von Entecavir-Triphosphat (die aktive Form) alleine und in Kombination mit Lamivudin, Adefovir und Tenofovir (Konzentration $10 \times C_{\max}$) auf die mitochondriale Toxizität und die DNA-Polymerase γ wurde an HepG2 Zellkulturen untersucht. Eine 100fache C_{\max} Entecavir über 15 Tage hat keine Veränderungen bei der Zellproliferation, der Lactatkonzentration, der mtDNA und der Konzentrationen der COX II und IV mit sich gebracht. Auch wurde Entecavir nicht von der DNA-Polymerase γ erkannt und somit nicht in die mtDNA inkorporiert. Lamivudin und Tenofovir hemmten die Zellproliferation innerhalb der 15 Tage. Die Lactatkonzentration stieg bei Lamivudin und Adefovir in der 10fachen C_{\max} Konzentration nicht an, allerdings war bei der 100fachen C_{\max} ein signifikanter Lactatanstieg zu verzeichnen, so dass in hohen Konzentrationen bei diesen Substanzen einige Anzeichen einer mitochondrialen Toxizität beobachtet werden konnte. Adefovir und Tenofovir änderten wie Entecavir nichts am mtDNA-Gehalt (Mazzucco *et al.*, 2008). Diese Studie wurde allerdings im Forschungslabor von Bristol-Myers Squibb durchgeführt, so dass bei diesen Ergebnissen ein Bias nicht auszuschließen ist. Außerdem scheint das Ergebnis klinisch irrelevant, da solche hohen Konzentrationen beim Patienten unter der HBV-Therapie nicht vorkommen. Somit sind diese Effekte in vivo nicht zu erwarten.

Auch in Kombination mit anderen Nucleosid- bzw. Nucleotidanaloga, die gegen HBV eingesetzt werden, also Lamivudin, Adefovir und Tenofovir ergaben sich in dieser Studie keine Anzeichen für mitochondriale Toxizität, allerdings konnte für diese Substanzen in anderen Untersuchungen eine in-vitro-Inhibition der DNA-Polymerase γ wiederum in unterschiedlich starkem Ausmaß nachgewiesen werden (Cherrington *et al.*, 1994, Brinkman *et al.*, 1998). Lamivudin-Triphosphat wird außerdem als Substrat der 3'-5'-Exonuclease-Aktivität der DNA-Polymerase γ erkannt und somit nur zu einem geringeren Anteil in die mtDNA integriert (Gray *et al.*, 1995).

Dennoch liegen laut Herstellerangaben bei Patienten in vivo auch über längere Anwendungszeiträume für Lamivudin, Adefovir und Tenofovir keine Hinweise für mitochondriale Toxizität vor, ebenso wie in HepG2-Kulturen in vitro in anderen Untersuchungen für diese Substanzen keine Anzeichen für mitochondriale Schäden festgestellt werden konnten (Birkus *et al.*, 2002).

Letztendlich zeigten all diese Studien so wie die vorliegende Arbeit anhand der Ergebnisse des HBV-Kollektivs auch, dass die Nucleosidanaloga, die bei der Therapie der chronischen Hepatitis B eingesetzt werden, in therapeutischen Konzentrationen keinen relevanten Einfluss auf das mitochondriale Membranpotential zu haben scheinen, so dass bei der Therapie der Hepatitis B auch nicht mit entsprechenden Mitochondrien-assoziierten Nebenwirkungen zu rechnen ist.

Auch erfolgte keine Steigerung des MMP unter der Therapie. Dieser Effekt war allerdings nicht zu erwarten, da das MMP primär durch die Infektion in dieser Studie nicht erniedrigt war gegenüber dem gematchten Normalkollektiv. Das HB-Virus hat keinen Einfluss auf das MMP gezeigt, was sich durch den Vergleich des untherapierten HBV-Kollektivs mit dem Normalkollektiv zeigen lies.

V.3 Mitochondriales Membranpotential und Apoptoserate der PBMC beim HCV-Kollektiv im Vergleich zum Normalkollektiv

Es konnte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den MMPs der PBMC bei den untersuchten HCV-Patienten gegenüber den Probanden des Normalkollektivs festgestellt werden. Es zeigte sich beim Vergleich der therapierten mit den untherapierten HCV-Patienten ein Trend, dass das MMP unter einer Therapie mit IFN- α

und Ribavirin niedriger ist als bei den untherapierten Patienten mit chronischer HCV-Infektion. Auch waren die MMPs beim therapierten HCV-Kollektiv statistisch im Trend niedriger als beim gematchten Normalkollektiv. Daraus lässt sich die Hypothese ableiten, dass nicht die HCV-Infektion per se, sondern das Therapieregime aus Ribavirin und IFN- α mitochondrientoxisch zu sein scheint. Der Unterschied bei den MMPs zwischen den untherapierten HCV-Patienten und einem gematchten Normalkollektiv war statistisch nicht signifikant. Allerdings handelt es sich nur um statistische Trends und die Fallzahlen bei den Untergruppen sind gering.

Die Apoptoseraten der PBMC dieser beiden Kollektive unterschieden sich nicht, so dass das bei den HCV-Patienten erniedrigte MMP nicht zu einer verstärkten Apoptose führte und umgekehrt sich das erniedrigte MMP nicht durch eine erhöhte Apoptoserate erklären ließ. Möglicherweise waren die MMPs nicht weit genug erniedrigt, um den Mechanismus der Apoptose auslösen zu können. Alternativ könnte es sein, dass zusätzliche Stimuli benötigt werden, um den Apoptosemechanismus der Zellen in Gang zu setzen. In einer anderen Studie wurde festgestellt, dass bei chronischer HCV-Infektion PBMC vermehrt Fas auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Dies war vor allem der Fall, wenn in den Zellen HCV-RNA nachgewiesen werden konnte. Daher kann man davon ausgehen, dass die vermehrte Fas-Expression durch die HCV-Infektion der Zellen hervorgerufen wird. Allerdings benötigte man für die Auslösung der Apoptose noch einen zusätzlichen Stimulus, zum Beispiel in Form des FasL. Dies könnte eine Erklärung sein, weshalb einige Patienten mit chronischer Hepatitis C weniger PBMC aufweisen (Taya *et al.*, 2000). Jedoch bedeutet dies nicht, dass Patienten mit chronischer Hepatitis C stets eine erhöhte Apoptoserate unter den PBMC aufweisen. Wenn diese unbekanntes zusätzlichen Stimuli ausbleiben, kann die Apoptoserate, wie in der vorliegenden Studie gezeigt, durchaus normal sein. Die Zellen sind aber unter Umständen stärker anfällig für Apoptose. Dies konnte in der hier diskutierten Studie nicht nachgewiesen werden, da die Zellen nur unstimuliert untersucht wurden. Die gesteigerte Neigung von PBMC zur Apoptose und vermehrte Bcl-2 Expression nach Stimulation bei Patienten mit chronischer Hepatitis C wurden jedoch bereits anderweitig untersucht. Betrachtet wurden per FACS sortierte CD4 positive und CD8 positive T-Lymphozyten und Monozyten (CD14 positiv). Apoptose wurde durch Entzug von Nährmedium, Anti-CD3-Antikörper beziehungsweise Phorbol-12-myristinat-13-acetat (PMA) induziert. Mit zunehmender Schwere der Lebererkrankung war die Neigung aller untersuchter Zelltypen zur Apoptose (Annexin V-FITC und PI, Trypanblaufärbung,

Färbung mit Hoechst 33342, was an dsDNA bindet und Kondensation der Zellkerne anzeigt) unter Entzug von Serum als Medium erhöht. Gleichzeitig war die Bcl-2-Expression vermindert. Bei Zugabe von anti-TNF- α -AK und anti-FasL-AK und anschließender Inkubation änderte sich nichts bezüglich der Apoptoseraten der Zellen, so dass man von einem anderen Weg der Apoptoseinduktion, unabhängig von Fas/FasL und TNF- α bei Entzug des Nährmediums ausgehen muss. Diese veränderten Apoptoseeigenschaften der Zellen durch die Bcl-2 Verminderung korreliert mit der Immundysfunktion, die man bei fortgeschrittener Lebererkrankung bei Hepatitispatienten vorfindet und könnte laut der Autoren eine Rolle für die Viruspersistenz und das Voranschreiten der Lebererkrankung spielen (Nakamoto *et al.*, 2002). Darüber hinaus wurde vor kurzem berichtet, dass ein Abfall des MMP bzw. der mtPTP per se nicht zu einer Caspasenaktivierung führt, so dass die Rolle der Verminderung bzw. des Zusammenbruchs des MMP bei der Apoptose noch nicht vollständig verstanden ist. Auch kann es unabhängig von der Apoptose zu einer Verminderung des MMP kommen bzw. die Verminderung des MMP führt nicht zwangsläufig zu einer Triggerung der Apoptose (Lugli *et al.*, 2005). Außerdem hatte Interferon- α (welches die therapierten HCV-Patienten bekamen) in einer Studie nur einen geringen Effekt auf die Apoptoserate von PBMC in Kultur gezeigt, so dass auch unter der Therapie nicht unbedingt eine erhöhte Apoptoserate selbst bei vermindertem MMP zu erwarten ist (Kaser *et al.*, 1999). All diese Ergebnisse liefern Erklärungen, warum die Apoptoserate beim HCV-Kollektiv sich statistisch nicht von der des Normalkollektivs unterschied. Jedoch könnte man die Anfälligkeit der PBMC HCV-Infizierter für Apoptose in weiteren Studien untersuchen, in dem man die Zellen in vitro stimuliert.

Bezüglich der aufgetretenen Laborveränderungen sind die Erhöhungen der Transaminasen und des Bilirubins bei der chronisch-aktiven Verlaufsform der Hepatitis C zu erwarten (Mummadi *et al.*, 2010). Die Anämie und Thrombopenie bei einem Patient traten unter der Interferon- und Ribavirin-Therapie auf. Diese Nebenwirkungen wurden in der Literatur bereits beschrieben (De Franceschi *et al.*, 2000, Garcia-Garcia *et al.*, 2010).

Die statistisch signifikante Erniedrigung der MMPs beim HCV-Kollektiv im Vergleich zum gematchten Normalkollektiv könnte allerdings nicht nur auf die Therapie mit

Interferon- α und Ribavirin zurückzuführen sein, sondern HCV selbst könnte auch eine mitochondrientoxische Wirkung auf infizierte Zellen ausüben.

In Hepatozyten scheint es ein stadienabhängiges Protein-Expressionsmuster bei chronischer Hepatitis C-Infektion zu geben. Somit ist davon auszugehen, dass die Hoch- beziehungsweise Herunterregulierung bestimmter Proteine, unter anderem wohl Enzyme und dadurch erklärbare Veränderungen in bestimmten Stoffwechselwegen, eine Rolle bei der Pathogenese der Lebererkrankung bei der Virushepatitis C spielt. Analog zur chronischen Hepatitis B sollen oxidativer Stress und mitochondriale Dysfunktion in Hepatozyten einen wichtigen pathogenetischen Mechanismus bei der Entstehung der Leberfibrose beziehungsweise der Leberzirrhose darstellen (Diamond *et al.*, 2007, Piccoli *et al.*, 2006, Wang & Weinman, 2006, Okuda *et al.*, 2002, Hara *et al.*, 2006, Machida *et al.*, 2006).

Um Rückschlüsse auf den Einfluss des HCV auf die Mitochondrien der PBMC treffen zu können stellt sich bei der Interpretation der Ergebnisse der hier diskutierten Arbeit wie bei der Hepatitis B-Infektion die Frage, ob PBMC überhaupt mit HCV infiziert sind und somit ein geeignetes Untersuchungsmedium für den Einfluss von HCV auf das MMP darstellen. Hierzu wurden bereits direkte Untersuchungen durchgeführt.

HCV infiziert nicht nur Hepatozyten, sondern es sind auch verschiedene extrahepatische Manifestationen bei dieser Erkrankung bekannt. Als extrahepatische Replikationsorte werden Zellen des peripheren Blutes und des Knochenmarks, Zellen des Gallengangsystems sowie Speicheldrüsen, Epithelien, Schilddrüse, Pankreas, Milz, Lymphknoten, Nebennieren und das ZNS diskutiert (Zignego *et al.*, 2007).

Für eine Beteiligung der PBMC bei der HCV-Infektion spricht unter anderem die bereits gelungene Detektion von HCV-RNA in PBMC bei Patienten, deren Serum nicht viräm war (Zignego *et al.*, 2007) und darüber hinaus wurde die Persistenz von HCV-RNA in PBMC bei Patienten, die auf eine Therapie ansprachen und bei denen weder im Serum noch in der Leber HCV-RNA nachweisbar war, über einen langen Zeitraum nachgewiesen (Pham *et al.*, 2004). Es wurde sogar festgestellt, dass HCV-RNA aus in Kultur gehaltenen PBMC HCV-infizierter Patienten ins Kulturmedium abgegeben wurde. Dies wurde als Hinweis gewertet, dass HCV in PBMC repliziert (Baré *et al.*, 2005). Bei Patienten mit chronischer Hepatitis C war in einer Studie nur bei 25% der Patienten HCV-RNA in PBMC nachweisbar. In diesen Zellen konnten sowohl Plusstränge als auch Minusstränge nachgewiesen werden, was für die aktive Virusreplikation in PBMC

spricht. Allerdings bedeutet dies nicht zwangsläufig, dass ganze infektiöse Viruspartikel entstehen. Falls doch, könnten die infizierten PBMC als Reservoir dienen, wodurch sich auftretende Rezidive nach Lebertransplantation erklären ließen (Chang *et al.*, 1996). Da in der vorliegenden Arbeit nur Patienten mit einer chronischen Hepatitis C eingeschlossen wurden ist demnach damit zu rechnen, dass bei ca. 25% der untersuchten Patienten die PBMC HCV-RNA aufwiesen. Bei künftigen Studien über verwandte Themen wäre die Untersuchung des Vorkommens von HCV-RNA in den isolierten Zellen sinnvoll, damit diesbezüglich nicht alleine über die Ergebnisse der genannten Studien Rückschlüsse gezogen werden müssen. Genereller Kritikpunkt bei den bisherigen Untersuchungen ist die Detektion der HCV-RNA-Minusstränge via PCR, die unter Umständen durch einen Überschuss an genomischer HCV-RNA, welche als Template dienen könnte, im Sinne einer falsch positiven Reaktion die Minusstränge erkennt (Zignego *et al.*, 2007).

Ein weiterer Hinweis für den Lymphtropismus des HCV ist, dass virale Proteine und HCV-RNA auch in PBMC und in mononukleären Zellen des Knochenmarks entdeckt wurden. Allerdings wurden die Proteine nur bei 4 von 11 untersuchten HCV-positiven Patienten in Monozyten und B-Lymphozyten und sogar nur bei 3 der Patienten in T-Lymphozyten des Knochenmarks und bei einem in T-Lymphozyten des Blutes festgestellt. HCV-RNA wurde bei 6 Patienten gefunden, und dann immer in allen untersuchten Zelltypen. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die mononukleären Zellen des Blutes und des Knochenmarks nicht bei jedem Patienten infiziert sind. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass unterschiedliche Mutanten des Virus unterschiedlichen Lymphtropismus aufweisen. Andererseits war unter Umständen die von dieser Arbeitsgruppe verwendeten Methoden (NISH, nicht-isotopische in situ Hybridisierung und Immunfluoreszenz) nicht sensitiv genug (Sansonno *et al.*, 1996).

Ein anderer bisher offener Punkt ist, welche Zelltypen der PBMC infiziert werden können. In einigen Untersuchungen wurde HCV-RNA in allen Subtypen nachgewiesen, in anderen vor allem in B-Lymphozyten. Dendritische Zellen sind ebenfalls ein favorisierter Kandidat für die extrahepatische Infektion durch HCV (Barría *et al.*, 2008). Eine weitere Überlegung ist, dass HCV in PBMC gelangen muss, um sie infizieren zu können. HCV scheint an LDL zu binden und durch LDL-Rezeptoren in die PBMC zu gelangen (Agnello *et al.*, 1999, Thomssen *et al.*, 1992, Thomssen *et al.*, 1993). Auch durch das Glycoprotein E2 über CD81 bzw. via Scavenger-Rezeptor der Klasse B Typ 1

(SR-B1, ein Rezeptor, der die Cholesterinaufnahme in PBMC ermöglichen soll) scheint HCV an die PBMC binden zu können (Pileri *et al.*, 1998). Der Scavenger-Rezeptor könnte auch eine Internalisierung des HCV in die PBMC ermöglichen (Yamada *et al.*, 2005).

Als Genotyp mit dem stärksten Lymphotropismus wird der Genotyp 1 angesehen, da bei diesem häufiger HCV-RNA in PBMC der Patienten nachgewiesen werden konnte, als bei den anderen Genotypen (Barría *et al.*, 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurden prinzipiell alle Genotypen in die Studie eingeschlossen. Insgesamt wurde bei 12 von 15 HCV-Patienten eine Genotypisierung vorgenommen und 11 davon wiesen Genotyp 1 auf (3x Genotyp 1a, 4x Genotyp 1b und 4x Genotyp 1 ohne weitere Untertypisierung), bei einem Patienten handelte es sich um eine Infektion mit einem Genotyp 2. Somit ist bei 11 Patienten mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für lymphotrope HC-Viren zu rechnen. All diese Ergebnisse sprechen demnach für einen Lymphotropismus des HC-Virus.

Andere Autoren kamen jedoch zu der Schlussfolgerung, dass es sich bei der in PBMC nachgewiesenen HCV-RNA lediglich um eine Kontamination oder eine passive Aufnahme der Viren in die PBMC handeln könnte und diese Zellen gar kein Ort der extrahepatischen HCV-Replikation darstellen (Meier *et al.*, 2001). Folge hiervon wäre, dass die viralen Proteine, die in mehreren Studien für die mitochondriale Toxizität des HC-Virus verantwortlich gemacht werden, in den PBMC nicht exprimiert werden. Somit ließe sich erklären, warum es in der vorliegenden Arbeit keinen signifikanten Unterschied zwischen untherapierten HCV-Patienten und dem Normalkollektiv gab und die These, dass die Therapie der HCV für die Verminderung des MMP verantwortlich war, wird weiter untermauert. Die Viruslasten der untersuchten HCV-Patienten waren sehr unterschiedlichen und reichten von nicht nachweisbar bis $2,2 \times 10^7$ U/ml, im Median lag sie bei 250000 U/ml. Somit ist es äußerst schwierig abzuschätzen, wie viele Patienten tatsächlich HCV-RNA in den PBMC aufwiesen und selbst wenn dies bekannt wäre, würde dies immer noch keine Virusreplikation mit viraler Proteinbiosynthese in den PBMC bedeuten.

Somit sind die Ergebnisse bezüglich des Lymphotropismus des HCV widersprüchlich. Zusammenfassend sieht es so aus, als wären PBMC als ein extrahepatischer Zelltyp zumindest bei einigen Patienten von Hepatitis C-Viren befallen. Auch hier stellt sich wie bei der Hepatitis B-Infektion die Frage, ob der MMP-Unterschied des HCV-Kollektivs

verglichen zum Normalkollektiv größer ausgefallen wäre, wenn alle Patienten infizierte PBMC aufwiesen. Allerdings wäre mit einer Verminderung des MMP nach derzeitigen Erklärungsmodellen am ehesten denkbar, wenn das Virus in PBMC replizieren würde und die Synthese der mitochondrientoxischen Proteine Core und NS5a dort stattfinden würde. Dies wurde bisher nicht eindeutig belegt. Das verglichen zum Normalkollektiv erniedrigte MMP der PBMC der HCV-Infizierten Gruppe könnte ein indirekter Beleg dafür sein, dass PBMC mit dem HC-Virus infiziert sind, falls der Mechanismus der MMP-Erniedrigung auf das Virus zurückzuführen wäre und nicht alleine auf das Therapieregime aus IFN- α und Ribavirin. Dies ist jedoch nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wahrscheinlicher, da kein statistischer Unterschied zwischen den MMPs der untherapierten HCV-Patienten und dem Normalkollektiv gefunden werden konnte.

V.4 Vergleich des therapierten HCV-Kollektivs mit dem nicht therapierten HCV-Kollektiv

Hier fiel ein statistischer Trend zu einem niedrigeren MMP beim HCV-Kollektiv unter Therapie gegenüber den untherapierten HCV-Patienten auf. Dies spricht für mitochondriale Toxizität des HCV-Therapieregimes aus Ribavirin und IFN- α .

In einer anderen Studie wurde der mtDNA-Gehalt in PBMC bei vier Patientenkollektiven mit insgesamt 192 Patienten gemessen. Es gab eine HIV-/HCV-negative Kontrollgruppe (11 Patienten), eine HIV-positive HCV-negative Gruppe (56 Patienten), eine HIV-negative HCV-positive Gruppe (18 Patienten) und eine Gruppe aus HIV-/HCV-Coinfizierten (107 Patienten). Die Kontrollgruppe hatte den höchsten mtDNA-Gehalt (Mittelwert war 757 Kopien/Zelle), die HIV-Monoinfizierten und die HCV-Monoinfizierten zeigten keinen signifikanten Unterschied, lagen aber insgesamt niedriger (428 respektive 349 Kopien/Zelle) als die Kontrollgruppe, und die Coinfizierten zeigten die niedrigsten Werte (296 Kopien/Zelle). 18 der coinfizierten Patienten wurden bezüglich ihrer Hepatitis C mit Interferon und Ribavirin behandelt, woraufhin eine weitere Verminderung des mtDNA-Gehalts festgestellt werden konnte (189 Kopien/Zelle). Diese Ergebnisse erklären unter Umständen das höhere Risiko bei coinfizierten Patienten für eine Lipodystrophie unter einer HAART und warum das Risiko für diese Nebenwirkung

unter einer zusätzlichen Hepatitis C-Therapie nochmals zunimmt (de Mendoza *et al.*, 2005). Diese Beobachtung deckt sich bezüglich der Ergebnisse bei den untherapierten HCV-Monoinfizierten nicht mit den in der vorliegenden Studie vorgestellten Ergebnissen. Die Beobachtung bezüglich der HCV-Therapie wäre aber in Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zu bringen, falls es sich nicht nur um eine Verstärkung der toxischen Wirkung der HAART handeln würde. Dafür spricht aber, dass bei HIV/HCV-Coinfizierten mehrfach eine Verstärkung der mitochondrientoxischen Wirkung von Didanosin durch Ribavirin beobachtet werden konnte. An 85 Patienten wurde berichtet, dass eine Kombination aus Ribavirin und Didanosin oder Ribavirin plus Didanosin plus Stavudin vermehrt zu klinischen Nebenwirkungen, die im Zusammenhang mit mitochondrialer Toxizität stehen (siehe Kapitel I.1), führte. Mit anderen NRTI, PI und NNRTI bestand jedoch keine Assoziation zu mitochondrialer Toxizität (Fleischer *et al.*, 2004), sodass diese eher durch Didanosin und Stavudin hervorgerufen wird, als durch Ribavirin. Bei der Untersuchung von 113 HIV-HCV-coinfizierten Patienten vor Therapie der Hepatitis C (Ribavirin und Interferon zusätzlich zu HAART) und nach Beginn alle 4 Wochen bis zum Ende der Therapie, wurde ebenfalls häufiger ein Anstieg von Amylase, Lipase und Lactat und entsprechende klinische Nebenwirkungen wie Pankreatitis und Lactazidose beobachtet, wenn in der HAART Didanosin oder Didanosin plus Stavudin enthalten war. Die Einnahme von IFN- α war in dieser Untersuchung jedoch nicht mit dem Auftreten mitochondrialer Toxizität assoziiert (Laguno *et al.*, 2005). Auf Grund solcher Beobachtungen wurde die Empfehlung ausgesprochen, Ribavirin und Didanosin nicht zu kombinieren (Fleischer *et al.*, 2004). Erklärt wird die Verstärkung der Toxizität von Didanosin dadurch, dass Ribavirin die Phosphorylierung zur aktiven Triphosphat-Form des Didanosins beschleunigt (Fleischer *et al.*, 2004).

Ein völlig anderes Resultat, was ebenfalls im Widerspruch mit den Ergebnissen der hier diskutierten Studie stünde, erhielten Ballesteros ÀL *et al.* in einer Untersuchung der mitochondrialen Effekte einer 24-wöchigen Therapie mit Interferon und Ribavirin bei asymptomatischen HCV/HIV-coinfizierten Patienten, die ein HAART-Regime mit Didanosin, Stavudin oder beidem erhielten. Untersucht wurden der Quotient mtDNA/nDNA in PBMC und die Enzymaktivitäten der Atmungskettenkomplexe II, III und IV zur Baseline und 24 Wochen nach Baseline. Insgesamt wurden 26 Patienten untersucht, 16 erhielten weiterhin die HAART und dienten als Kontrollgruppe, 10 erhielten zusätzlich zu ihrer HAART die Hepatitis C-Therapie. In dieser Studie konnte

durch die Zugabe von Ribavirin plus Interferon keine Veränderung des Quotienten mtDNA/nDNA festgestellt werden und auch die Werte der Kontrollgruppe blieben über die Zeit stabil. Die Autoren postulierten, dass zusätzliche Auslöser notwendig seien, um die mitochondriale Funktion so zu verändern, dass es zu klinischen Symptomen entsprechender Nebenwirkungen kommen kann (Ballesteros *et al.*, 2004).

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ergeben sich dennoch Hinweise darauf, dass die Therapie der chronischen Hepatitis C Monoinfektion mit einer Kombination aus IFN- α und Ribavirin eine mitochondrientoxische Wirkung auf Lymphozyten ausübt, da sich bezüglich der MMPs zumindest ein Trend im Vergleich der therapierten mit der untherapierten HCV-Gruppe zeigte, ebenso im Vergleich der therapierten HCV-Patienten mit den gematchten Normalprobanden und zwischen dem untherapierten HCV-Kollektiv und den gematchten Normalprobanden kein statistischer Unterschied bestand. Bei graphischer Darstellung des MMP-Verlaufs der Patienten, die im Lauf der Therapie bzw. vor und nach Therapiebeginn untersucht wurden, fiel in Abbildung IV-11 ebenfalls eher der Trend zur Abnahme des MMP unter Therapie auf. Auf die statistische Auswertung dieser Werte wurde aufgrund der geringen Anzahl an Messpunkten verzichtet. Indirekt untermauern lässt sich diese Hypothese dadurch, dass erhöhte Serumkonzentrationen von sFas und sFasL unter Ribavirin- und Interferontherapie festgestellt werden konnten (Lapinski *et al.*, 2004). Kaser *et al.* konnten eine vermehrte Expression des Fas-Liganden und eine Hochregulierung von Fas bei mit Interferon- α plus ConA behandelten PBMC finden, was die Toxizität der HCV-Therapie weiter unterstreicht. Der Einfluss von IFN- α alleine auf vorher unstimulierte PBMC hingegen war nur minimal (leichte Zunahme von FasL mRNA). Die Apoptoserate der PBMC stieg unter alleiniger Zugabe von IFN- α zum Kulturmedium nur wenig an, so dass die Wirkung ohne zusätzliche Stimulation der Zellen nur schwach zu sein scheint (Kaser *et al.*, 1999). Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass die Apoptoserate bei den HCV-Patienten (inklusive der Therapierten) sich statistisch nicht von der des Normalkollektivs unterschied.

V.5 PEP-Kollektiv

Um den Einfluss der HIV-Infektion per se auf die Mitochondrien außer Acht lassen zu können und zu sehen, wie der Einfluss der Medikamente alleine auf das MMP ist, wurde die vorliegende Arbeit an PEP-Patienten durchgeführt, die im Verlauf ihrer ärztlichen Betreuung mehrfach auf HIV getestet wurden und bei denen alle Tests negativ ausgefallen waren.

Es konnte gezeigt werden, dass das MMP sich unter einer insgesamt 4 Wochen dauernden PEP bei HIV-negativen Personen bereits 2 Wochen nach Einnahmebeginn vermindert hat bis schließlich nach 4 Wochen der niedrigste Wert erreicht wurde. Zur 3-Monats-Kontrolle war das MMP im Median praktisch wieder auf den Ausgangswert angestiegen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Mallon PWG et al., die bei 20 gesunden Probanden, die entweder Zidovudin/Lamivudin oder Stavudin/Lamivudin erhielten, eine Verminderung der mtDNA-Transkription und somit des mtDNA-Gehalts bereits 2 Wochen nach Beginn der Einnahme feststellten. 6 Wochen nach Absetzen der Medikamente beobachteten sie ebenfalls eine Wiederzunahme des mtDNA-Gehalts (Mallon *et al.*, 2005).

Nicht bei allen Patienten konnte die Baselinemessung vor der ersten Medikamenteneinnahme vorgenommen werden. Zur Baseline wurden alle Patienten gewertet, die innerhalb 4 Tage nach Beginn der Medikamenteneinnahme in unserer Abteilung eintrafen. Ob dies bereits einen Einfluss auf das MMP hatte, ist vernachlässigbar, da das MMP bei den beiden anderen Kontrollen weiter abgenommen hat, so dass ohnehin von einem mitochondrientoxischen Einfluss der verabreichten Medikamente ausgegangen werden muss. Das MMP zur Baseline und zur 3-Monatskontrolle war vermutlich aus diesem Grund niedriger als das des gematchten Normalkollektivs, allerdings nicht signifikant.

Interessant war das Ergebnis eines Patienten, der statt Tenofovir/Emtricitabin eine Kombination aus Lamivudin/Zidovudin plus Lopinavir/Ritonavir erhielt. Bei diesem Patienten lag keine Baseline-Messung vor, allerdings zeigt sich ein starker Abfall des MMP von der 2-Wochen-Kontrolle bis hin zur 4-Wochen-Kontrolle, wo er das niedrigste MMP des gesamten untersuchten Kollektivs aufwies. Dies ist vermutlich auf die bekannte mitochondrienschädigende Wirkung des Zidovudin zurückzuführen. Er klagte

allerdings an Nebenwirkungen ausschließlich über Meteorismus und Diarrhoe, was sich vor allem durch die Einnahme von Lopinavir/Ritonavir erklären ließ, im Labor war das Gesamtcholesterin deutlich angestiegen, LDL hat sich mehr als verdoppelt, die TAG haben sich mehr als verdreifacht, die restlichen Werte waren unauffällig. Es konnte kein Wert für das MMP zur 3-Monats-Kontrolle erhoben werden, so dass nicht nachvollzogen werden konnte, ob sich das MMP innerhalb dieser Zeit wieder erholte. Aber auch ohne Berücksichtigung dieser Ergebnisse der 2- und 4-Wochen-Kontrollen zeigte sich in der Untergruppe, die eine Kombination aus Emtricitabin, Tenofovir und Lopinavir/Ritonavir erhielt, ebenfalls eine statistisch signifikante Abnahme des MMP während der PEP-Einnahme und der Wiederanstieg nach Absetzen der Medikamente. Dieses Ergebnis konnte auch bei einer Auswertung des prozentualen Anteils von Zellen mit vermindertem MMP nochmals bestätigt werden. Diese Resultate sprechen für das Potential dieser neueren NRTI, zumindest in Kombination mit Lopinavir/Ritonavir einen negativen Einfluss auf das MMP von PBMC ausüben zu können.

Das MMP korrelierte bei der Baselinemessung mit dem Gesamtcholesterin, ebenso bei der 2-Wochen-Kontrolle. In der 2-Wochen-Kontrolle konnten außerdem statistisch Korrelationen des MMP mit dem LDL bzw. der GOT festgestellt werden. Dies war allerdings bei den folgenden Kontrollen nicht mehr der Fall, so dass die Bedeutung dieser Ergebnisse unklar bleibt. Eventuell haben die Serumlipide einen gewissen Einfluss auf das MMP der PBMC. Jedoch waren die Korrelationen optisch nicht deutlich erkennbar und auf Grund der kleinen Fallzahl ist die Aussagekraft dieser Ergebnisse eingeschränkt. Die Apoptoserate korrelierte rechnerisch mit keinem Laborparameter.

Bei zwei Patienten stiegen die Transaminasen unter der PEP an, dies ist jedoch eine bekannte Veränderung der eingesetzten Medikamente Truvada® und Kaletra® (Gish *et al.*, 2005). Zwei Patienten zeigten bei der 2-Wochen-Kontrolle einen leichten Lipaseanstieg, dessen Relevanz unklar bleibt, da er zur 4-Wochen-Kontrolle nicht mehr nachweisbar war. Dies könnte eventuell mit dem eingesetzten Emtricitabin zusammenhängen, da es sich um eine in der Roten Liste® beschriebene Nebenwirkung dieses Medikaments handelt.

Es gibt viele Untersuchungen, die gezeigt haben, dass es unter einer antiviralen Therapie bei HIV-infizierten Patienten zu Nebenwirkungen kommen kann, die im

Zusammenhang mit mitochondrialer Dysfunktion stehen (Cossarizza *et al.*, 2003, McComsey *et al.*, 2005, Rabing Christensen *et al.*, 2004, Lichtenstein, 2005).

Nach der bisherigen Studienlage würde man davon ausgehen, dass neuere NRTI einen deutlich geringeren Effekt auf die mitochondriale Funktion ausüben als die älteren (Venhoff *et al.*, 2007, Vidal *et al.*, 2006, Caron *et al.*, 2008, Birkus *et al.*, 2002, Miró *et al.*, 2003, McComsey *et al.*, 2005, Ananworanich *et al.*, 2008, Miró *et al.*, 2005, López *et al.*, 2006). In dieser Arbeit konnte jedoch bei einem streng ausgesuchten Kollektiv nicht HIV-Infizierter Personen nachgewiesen werden, dass die Kombination von Tenofovir, Emtricitabin und Lopinavir/Ritonavir, die von 18 der 20 Untersuchten im Rahmen der PEP eingenommen wurde, eine signifikante Verminderung des MMP in PBMC ohne den Einfluss des HI-Virus bewirkt. Als Mechanismus könnte es sich um eine Inhibition der DNA-Polymerase γ handeln, was bereits für die älteren NRTI beschrieben wurde (Cherry *et al.*, 2005, Lewis *et al.*, 2003). Voraussetzung dafür wäre, dass Tenofovir bzw. Emtricitabin von diesem Enzym erkannt werden. Diese Hypothese ließe sich durch die bisher nicht erfolgte Bestimmung des mtDNA-Gehalts der PBMC in einem vergleichbaren Kollektiv überprüfen. Alternativ könnte es sich um durch diese Substanzen verursachte Mutationen in der mtDNA handeln oder um eine direkte Inhibition der Atmungskettenenzyme, was allerdings in anderen Studien an Zellkulturen nicht belegt werden konnte (Venhoff *et al.*, 2007). Für Emtricitabin alleine und in Kombination mit Tenofovir wurde zuvor lediglich eine verminderte Zellproliferation von Hepatoblastomzellen in Kultur beschrieben (Venhoff *et al.*, 2007), so dass der Mechanismus der MMP-Erniedrigung auf zellulärer Ebene offen bleibt.

Es traten keine der Nebenwirkungen bei den PEP-Patienten auf, die mit mitochondrialer Dysfunktion assoziiert zu sein scheinen, so dass der Abfall des MMP subklinisch ablief. Das Auftreten von Nebenwirkungen ist allerdings bei einer Einnahmedauer von lediglich 4 Wochen nicht unbedingt zu erwarten. Darüber hinaus normalisierte sich das MMP 2 Monate nach Absetzen der Medikamente wieder, so dass nicht von bleibenden Schäden auszugehen ist. Die Überlebenszeit (Turnover) von Lymphozyten im peripheren Blut beträgt ca. 60-100 Tage (Little *et al.*, 1962). Daher stellt sich die Frage, ob die Mitochondrien der vorhandenen Lymphozyten sich nach Absetzen der Medikamente wieder erholen oder ob die Lymphozyten lediglich bereits erneuert sind. Die 3-Monats-Kontrollen erfolgten mehr als 60 Tage nach Absetzen der HAART, so dass man davon ausgehen muss, dass bereits viele neugebildete Lymphozyten in der Blutbahn waren.

Bezüglich der Apoptoserate der PBMC konnte keine Änderung unter PEP-Einnahme festgestellt werden, wobei es im Routinelabor zu einer leichten Verminderung der Leukozyten im peripheren Blut gekommen ist, die bei der 2-Wochen-Kontrolle am deutlichsten war, zur 4-Wochen-Kontrolle hatte der Median der Leukozytenkonzentration im Blut wieder zugenommen. Allerdings gab es einzelne Patienten, bei denen die Leukozyten deutlicher abgenommen hatten und auch zur 4-Wochen-Kontrolle noch niedriger waren. Bei Betrachtung des Differenzialblutbildes hatten vor allem die segmentkernigen Granulozyten abgenommen, die Zahl der Lymphozyten im peripheren Blut hatte im Median sogar zugenommen. Somit ist, das gesamte Kollektiv betrachtet, aus dem Blutbild keine erhöhte Apoptoserate der PBMC zu erwarten, da PBMC Lymphozyten und Monozyten umfassen. In anderen Studien wurde berichtet, dass ein Abfall des MMP bzw. der mtPTP per se nicht zu einer Caspasenaktivierung führen, so dass die Rolle der Verminderung bzw. des Zusammenbruch des MMP bei der Apoptose noch nicht vollständig verstanden ist und es auch unabhängig der Apoptose zu einer Verminderung des MMP kommen kann bzw. die Verminderung des MMP nicht zwangsläufig zu einer Triggerung der Apoptose führt (Lugli *et al.*, 2005). Dies wäre eine weitere Erklärung, warum eine Verminderung des MMP ohne eine gesteigerte Apoptoserate in den entsprechenden Zellen gefunden wurde.

Somit ist eine mitochondrienschädigende Wirkung auf PBMC durch die Medikamenteneinnahme selbst binnen der kurzen Zeit von 4 Wochen nachweisbar. Dies spielt vermutlich im Rahmen einer PEP keine große Rolle für die betroffenen Patienten, da der Effekt reversibel war und subklinisch ablief. Allerdings könnte die Mitochondrientoxizität auch der neueren NRTI bei der dauerhaften Einnahme im Rahmen der HIV-Therapie von Relevanz sein.

Eine weitere zu klärende Frage ist, ob der PI Lopinavir/Ritonavir evtl. zu der beobachteten Verminderung des MMP geführt hat bzw. einen Beitrag dazu geleistet hat. Hierzu lassen sich zwei Studien anführen, die in Kapitel I.7.3 genauer beschrieben wurden. In einer Studie führten die Autoren als Schlussfolgerung an, dass der PI Nelfinavir einige der mitochondrientoxischen Effekte der NRTI Zidovudin und Lamivudin (als Kombination unter dem Namen Combivir® erhältlich) bzw. Didanosin und Stavudin vermindern kann (Miró *et al.*, 2005). In der anderen Studie wurde festgestellt, dass PI die Apoptoseraten (CD95-Expression, Apo2.7-Expression und Annexin V-Bindung) von

CD4-positiven und CD8-positiven Lymphozyten, Gedächtniszellen und NK-Zellen scheinbar vermindern können, wohingegen NRTI diese erhöhen. Bei Patienten mit niedrigerer Helferzellzahl zu Beginn der Therapie gibt es unter einigen Experten die Meinung, dass man primär ein PI-haltiges HAART-Regime wählen sollte (Wasmuth *et al.*, 2003). Dies wäre eine weitere Erklärung, warum in der vorliegenden Studie keine Veränderung der Apoptoserate über die Zeit gefunden werden konnte, da die verwendete PEP den PI Lopinavir/Ritonavir enthielt.

Auch der Einfluss von Lopinavir/Ritonavir wurde bereits indirekt untersucht. In einer Arbeit wurde eine Gruppe von Patienten, die erst eine Kombination aus 2 NRTI (u. a. Didanosin, Stavudin, Zidovudin) plus Lopinavir/Ritonavir erhielten, auf eine Kombination aus Nevirapin plus Lopinavir/Ritonavir umgestellt. In einer Kontrollgruppe wurde die NRTI beibehalten und nur als Kombinationspartner auf Lopinavir/Ritonavir umgestellt. Es zeigte sich, dass der Quotient mtDNA/nDNA und die COX-Aktivität 24 und 48 Wochen nach dem Absetzen der NRTI anstiegen, wohingegen parallel durchgeführte DEXA-Scans keinen statistisch signifikanten Unterschied aufwiesen. Somit führte die immer noch Lopinavir/Ritonavir enthaltende Kombination zu einer Verbesserung der mitochondrialen Funktionsparameter, so dass der Einfluss von NRTI auf die mitochondriale Funktion größer zu sein scheint als der von PI (Negredo *et al.*, 2009).

In einer anderen Untersuchung reduzierte Lopinavir/Ritonavir die Zellviabilität von renalen Tubuluszellen signifikant. Dieser Effekt konnte jedoch durch die Addition von Tenofovir abgeschwächt werden. Somit scheint die Kombination aus Tenofovir mit Lopinavir/Ritonavir, wie sie bei den meisten der in der vorliegenden Studie untersuchten PEP-Patienten eingesetzt wurde, insgesamt wenig mitochondrientoxisch zumindest auf renale Tubuluszellen zu sein (Vidal *et al.*, 2006). Trotzdem konnte zumindest in der Kombination mit Emtricitabin, was in der Studie von Vidal nicht mit untersucht wurde, allerdings bei den PEP-Patienten noch mit in das Standardregime gehörte, eine Verminderung des mitochondrialen Membranpotentials in PBMC gefunden werden.

V.6 Diskussion der Methodik

V.6.1 Einflussfaktoren auf das mitochondriale Membranpotential bzw. die Apoptoserate von PBMC

Es gibt einige Umstände, unter denen das MMP oder die Apoptoserate von PBMC verändert werden können. Beispielsweise kann intensives körperliches Training laut einer Studie das mitochondriale Membranpotential in PBMC vermindern und zu einer erhöhten Apoptoseneigung führen (Tuan *et al.*, 2008). Diese Effekte traten direkt nach dem Training auf und hielten bis zu 72 Stunden nach Trainingsabschluss an. Ebenso kann eine Sepsis zu einer Verminderung des MMP in PBMC führen. In einer Studie von Adrie C *et al.* postulierten die Autoren sogar, dass das mitochondriale Membranpotential in PBMC bei Patienten mit schwerer Sepsis einen Marker für den Schweregrad der Sepsis darstellen könnte (Adrie *et al.*, 2001). Auch die Einnahme von Neuroleptika führte in einer Studie von Casademont J *et al.* zu einer Hemmung der Aktivität des mitochondrialen Complex I und zu einem geringeren Sauerstoffverbrauch durch die Mitochondrien, wobei dieser Effekt bei klassischen Neuroleptika stärker ausgeprägt war als bei den atypischen (Casademont *et al.*, 2007). Bei nicht therapierter essentieller Hypertonie fanden Giner V *et al.* heraus, dass Patienten mit Mikroalbuminurie vermehrt oxidativen Stress in PBMC aufwiesen, da mehr reduziertes Glutathion vorlag als bei Patienten ohne Mikroalbuminurie, allerdings wurde in dieser Arbeit das MMP in den PBMC nicht bestimmt, so dass sich die Aussage rein auf den beobachteten vermehrten oxidativen Stress in diesen Zellen beschränkt (Giner *et al.*, 2004). Auch bei hypertensiven Patienten ohne Mikroalbuminurie scheint gegenüber Probanden mit normalem Blutdruck der oxidative Stress in PBMC verstärkt zu sein. In der hier diskutierten Studie erfolgte eine Blutdruckmessung bei 13 der 15 HBV-Patienten (Median 125/80 mmHg, Minimum 100/70 mmHg, Maximum 160/110 mmHg, ein Patient hatte nach den Leitlinien der deutschen Hochdruckliga (Deutsche Hochdruckliga e.V. DHL®, 2008) einen erhöhten Wert), bei 11 der 15 HCV-Patienten (Median 125/80 mmHg, Minimum 105/75 mmHg, Maximum 140/90 mmHg, 2 Patienten hatten eine bekannte arterielle Hypertonie, jedoch hatte keiner bei der Messung einen erhöhten Blutdruck) und bei 8 der 20 PEP-Patienten (Median 140/80 mmHg, Minimum

120/70 mmHg, Maximum 155/105 mmHg, ein Patient hatte einen erhöhten Wert). Somit wurden zwar nicht alle untersuchten Patienten auf eine arterielle Hypertonie gescreent, jedoch erscheint ein statistisch größerer Einfluss zumindest bei den Hepatitis-Kollektiven unwahrscheinlich.

Das Patientenalter scheint ebenfalls einen Einfluss auf das Apoptoseverhalten bei PBMC zumindest *ex vivo* zu haben. Die PBMC wurden in Kultur gehalten und die Apoptoseraten wurden sowohl unstimuliert als auch stimuliert (mit PMA und Influenzaimpfstoff) nach jeweils 6 und 24 Stunden mittels Annexin-V- und PI-Färbung gemessen. PMA induzierte bei den jungen und den älteren Personen Apoptose in gleichem Maß, während der Effekt des Influenzaimpfstoffs bei den jungen Personen stärker ausgeprägt war (Szmit *et al.*, 2002). In der hier vorliegenden Arbeit konnten keine Korrelationen zwischen dem MMP bzw. der Apoptoserate und dem Patientenalter oder Geschlecht bei den einzelnen Kollektiven festgestellt werden, so dass es keinen Einfluss gegeben zu haben scheint. Außerdem wurden die Kollektive zum Vergleich nach dem Alter gematcht. Bei Vitiligo-Patienten in der aktiven Phase konnten von Dell'Anna ML *et al.* ebenfalls in PBMC im Vergleich zu einem Normalkollektiv vermehrter oxidativer Stress, eine Inhibition der COX-I, ein vermindertes mitochondriales Membranpotential und vermehrter Zelltod festgestellt werden (Dell'Anna *et al.*, 2003).

Um zumindest einige dieser Einflüsse zu überwachen, wurde bei jedem Patienten ein Routinelabor durchgeführt. Die Durchführung des Blutbildes diente dem Anämieausschluss, um die Zahl der Leukozyten zu kontrollieren (für die PBMC-Isolation) und um die Zahl der Thrombozyten zu sehen. Diese konnten nicht vollständig aus den Proben ausgewaschen werden und stellten unter Umständen einen Einfluss auf die Färbungen dar, sie wurden zusätzlich in den Stichproben mikroskopisch ausgezählt. Das Differenzialblutbild diente der Kontrolle des Anteils der Lymphozyten und Monozyten (also der PBMC, die aus dem Studienblut isoliert wurden) an den Leukozyten. Außerdem kann sich das Blutbild unter den verschiedenen Therapien ändern, vor allem durch die Interferon- α Therapie bei HCV-Infektion. Durch die Kontrolle der Nierenparameter Creatinin und Harnstoff wurden zumindest schwere Nierenfunktionsstörungen weitgehend ausgeschlossen, durch die Bestimmung der Leberparameter GOT, GPT, γ -GT, aP und Bilirubin wurden Lebererkrankungen, Cholestase und der Einfluss der chronischen viralen Hepatitiden (Schwere der Erkrankung) bzw. der antiretroviralen Medikamente auf die Leber überprüft. Bezüglich Alter und Geschlecht gab es bis auf den Ausschluss Minderjähriger von der

Studienteilnahme keine Einschränkungen. Verzerrungen könnten sich bei den Hepatitiskollektiven jedoch durch die geringen Fallzahlen und durch gehäufte Verweigerung der Teilnahme an der Studie durch bestimmte Patientengruppen ergeben haben, worauf allerdings kein Einfluss zu nehmen ist.

V.6.2 Validierung der Methode

Zur Detektion des MMP gilt die JC-1-Färbung derzeit als Goldstandard (Cossarizza, 2003) auf Grund der einfachen Handhabung, der Unabhängigkeit der Ergebnisse von der Konzentration des Farbstoffs über einen weiten Bereich und der hohen Spezifität für Mitochondrien. Allerdings ist die Sensitivität für eine Änderung des MMP gering, wenn dieses weniger als 100mV beträgt (Cossarizza, 2003). Zur Detektion des MMP werden Rhodamine-123 und DiOC₆(3) auf Grund ihrer geringen Spezifität und Sensitivität nicht mehr verwendet. Darüber hinaus inhibiert Rhodamine-123 die ATP-Synthase und kann somit zu einer Änderung des MMP während der Inkubation führen (Modica-Napolitano *et al.*, 1984). DiOC₆ scheint sensibler für das Plasmamembranpotential zu sein als für das MMP (Jenssen *et al.*, 1986). Methoden, die an isolierten Mitochondrien durchgeführt werden, wie z.B. die TPP⁺-Elektrode, haben das Problem, dass man für die Untersuchung der Mitochondrien aus Lymphozyten zu viel Material bräuchte und somit bei den Studienteilnehmern eine unzumutbare Menge Blut abnehmen müsste (Cossarizza, 2003). MitoTracker Red CMXRos hat eine hohe Sensitivität, obwohl bei diesem Farbstoff keine Farbänderung in Abhängigkeit vom MMP auftritt, sondern eine Änderung der Farbintensität. Bei dieser Färbung müssen die Zellen jedoch fixiert werden, so dass die Detektion eines MMP-Verlustes nach der Färbung, wie sie in dieser Arbeit bei den Positivkontrollen durchgeführt wurde, nicht möglich ist (Poot & Pierce, 1999).

Man muss bei der Interpretation der Daten berücksichtigen, dass Mitochondrien sowohl innerhalb eines bestimmten Zelltyps als auch zwischen verschiedenen Zelltypen sehr heterogen bezüglich Form und Größe sind, dass beim Vorgang der Apoptose innerhalb einer Zelle nicht alle Mitochondrien das MMP verändern und dass Apoptose sogar komplett ohne Änderung des MMP ablaufen kann, ohne dass die Mechanismen und Gründe hierfür bekannt wären (Lugli *et al.*, 2005).

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie hat man den Vorteil, einzelne Zellen beurteilen zu können und mit geringen Mengen an Farbstoff zu arbeiten, so dass eine Toxizität, die durch den Farbstoff per se ausgelöst wird, unwahrscheinlicher erscheint (Cossarizza, 2003).

Ein Problem bei der Methode der PBMC-Isolation über die Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation ist, dass sich nicht nur PBMC in der Suspension befinden, sondern auch Thrombozyten. Selbst nach 3 Waschvorgängen können noch deutlich mehr Thrombozyten als Lymphozyten in der Probe sein (Banas *et al.*, 2004), und die genaue Anzahl an verbleibenden Thrombozyten kann nicht vorhergesagt werden. Dies bereitet zusätzliche Schwierigkeiten bei der Interpretation der Ergebnisse. Die einzige zuverlässige Möglichkeit, diesen unklaren Einflussfaktor auszuräumen, ist die Sortierung der Lymphozyten. Dies war allerdings mit dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten FACScan nicht möglich.

Von Verhoeven AJ *et al.* wurde 2005 das MMP in Thrombozyten mittels JC-1 ermittelt, und zwar als Marker für die Qualitätskontrolle bei der Lagerung von Thrombozytenkonzentraten. Allerdings können die Ergebnisse des Verhältnisses FL-2/FL-1 aus dieser Arbeit nicht mit der hier diskutierten Arbeit verglichen werden, da auch die Instrument-Settings jeweils eine Rolle spielen und somit nur mehrere Gruppen, die in einem Labor an einem FACS-Gerät untersucht wurden, zuverlässig miteinander verglichen werden können und nicht die Ergebnisse unterschiedlicher Personen aus unterschiedlichen Labors. In der Arbeit von Verhoeven wird ebenfalls auf die Wichtigkeit der Standardisierung der Methoden, verwendeten Reagenzien, der Mengen bzw. Konzentrationen und Zeiten hingewiesen, was sich mit unseren Beobachtungen deckt (Verhoeven *et al.*, 2005).

Der Einfluss der verbliebenen Thrombozyten dürfte außerdem z.B. bei der Messung des Quotienten mtDNA/nucleäre DNA (eine andere gängige Möglichkeit der Ermittlung von mitochondrialer Dysfunktion) einen größeren Einfluss haben als bei der JC-1-Färbung, da Thrombozyten viele Mitochondrien, aber keinen Kern besitzen und somit dieses Verhältnis natürlich stark verfälscht wird (de Mendoza *et al.*, 2004, Banas *et al.*, 2004). Außerdem waren in allen Proben Thrombozyten enthalten, so dass sich der dadurch entstandene Fehler beim Vergleich der Kollektive ausmitteln sollte.

Die Validierung der Durchführung der Methode hat sich als äußerst schwierig erwiesen. Zum einen mussten die Proben immer sofort angesetzt und direkt im Anschluss

gemessen werden, da sich die Ergebnisse innerhalb von Minuten bis Stunden *in vitro* verändern. Dabei nimmt das MMP der isolierten Zellen ab und die Apoptoserate nimmt, wenn man die Proben stehen lässt, zu. Dies wurde während der Etablierung der Methode in unserem Labor beobachtet. Somit musste man sich bei der Durchführung der Zellisolation, der Färbung und der Messung am FACS an einen exakten Zeitplan halten, um den möglichen Fehler für alle Proben möglichst gleich zu halten und somit die Vergleichbarkeit der einzelnen Proben zu gewährleisten. Dadurch war es nicht möglich, für die Reproduktion der Messungen 2 Proben beim Probanden abzunehmen und diese nacheinander zu bearbeiten, da eine Probe zu lange stehen würde und die Ergebnisse dadurch nicht mehr reproduzierbar wären. Zu verschiedenen Zeitpunkten bei dem gleichen Probanden Blut zu entnehmen und somit eine Reproduktion zu erzielen ist ebenfalls nicht zuverlässig möglich, da das MMP und die Apoptoserate natürlich Schwankungen unterliegen sind und dadurch die Werte bei derselben Person von einem auf den nächsten Tag unterschiedlich sein können. Darüber hinaus werden diese beiden Parameter von verschiedenen weiteren Einflüssen verändert, von denen nur einige bekannt sind (z.B. körperliches Training, Erkältungen etc.) (Tuan *et al.*, 2008). Auch dies kann zu unterschiedlichen Ergebnissen zu verschiedenen Zeitpunkten bei derselben Person führen. Es wurde zwar vor jeder Messung nach intensivem körperlichen Training und nach Einnahme anderer Medikamente gefragt und zusätzlich ein Routinelabor durchgeführt um einige Störgrößen auszuschließen, allerdings sind damit nicht alle Einflüsse eliminiert, da viele noch gar nicht bekannt sind. Somit ist keine Untersuchung der Ergebnisse auf ihre Richtigkeit hin möglich, und die Ergebnisse können sich je nach Labor und Untersucher unterscheiden. Deswegen wurde ein nach Alter und Geschlecht gematchtes Normalkollektiv zum Vergleich herangezogen, und eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist durch die Standardisierung der Durchführung im Labor gegeben. Folglich können Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen durchaus festgestellt werden, falls die Fallzahl und die Power des Tests ausreichen und ein tatsächlicher Unterschied vorhanden ist. Die gesunden Probanden wurden über die Studiendauer verteilt und nicht alle blockweise am Anfang oder Ende untersucht, um methodische Abweichungen bei den Untersuchungen der einzelnen Kollektive und eventuelle Einflüsse durch Veränderungen über die Zeit detektieren zu können. Die Durchführung weiterer Färbungen, die Veränderungen mitochondrialer Funktionen anzeigen, kann zur weiteren Validierung der Methode in künftigen Arbeiten erfolgen.

Die Tatsache, dass sich das MMP und die Apoptoserate so schnell nach der Blutentnahme ändern, ist in einer anderen Arbeit allerdings nicht bestätigt worden (Cassart *et al.*, 2007). Der Sinn dieses Artikels bestand in der Validierung der JC-1-Färbung. Untersucht wurde das MMP in PBMC bei Pferden mit Myopathie mittels JC-1-Färbung. Die Proben wurden nach der Blutentnahme in Citrat-Röhrchen 30 Min., 90 Min., 150 Min., 5 Stunden und 24 Stunden lang bei Raumtemperatur stehen gelassen. Für die Blutentnahme wurden Citrat-Röhrchen empfohlen, welche in der hier diskutierten Studie ebenfalls verwendet wurden. Allerdings wurde beobachtet, dass man die Proben bis zu 5 Stunden bei RT stehen lassen kann, bevor man mit der Zellisolation beginnt. Erst danach änderten sich die Werte.

Außerdem gibt es einige Publikationen, in denen mit Hilfe der gleichen Färbungen das MMP bzw. die Apoptoserate von PBMC unter anderen Umständen untersucht wurden. In einigen dieser Studien wurde ebenfalls ein Normalkollektiv untersucht. In Publikationen, in denen die Apoptoserate von PBMC untersucht wurde, lagen die Werte bei unstimulierten Zellen bei ungefähr 1-10%. Tuan *et al.* haben bei unstimulierten PBMC eine Apoptoserate bei Normalprobanden von ca. 1-4% festgestellt, bei Neutrophilen ca. 4% (mittels Annexin-V- und PI-Färbung) (Tuan *et al.*, 2008). Szmit *et al.* untersuchten PBMC bei jungen und älteren gesunden Personen ebenfalls mittels Annexin-V-FITC und PI Färbung. Sie fanden nach 6 Stunden in Kultur 2,8% frühapoptotische PBMC und 5,26% spätapoptotische bei den jungen Personen und 5,29% früh- bzw. 4,65% spätapoptotische PBMC bei den Älteren (Szmit *et al.*, 2002). Hodge *et al.* veröffentlichten eine Arbeit, in der die Apoptoserate von PBMC mit Hilfe der Annexin V-Färbung in verschiedenen Zellkulturen verglichen wurde. Zum einen wurden PBMC isoliert und in Kultur gehalten, zum anderen wurden die Zellen aus Vollblut in Kultur gehalten ohne vorherige Isolation eines bestimmten Zelltyps. In Medium ohne Zugabe eines Stimulans für die Apoptoseinduktion lag die Apoptoserate von T-Lymphozyten nach 4 Stunden in der Vollblutkultur bei ungefähr 4%, die der isoliert gehaltenen T-Lymphozyten bei 10%. Die Apoptoserate der Monozyten lag in der Vollblutkultur bei 5%, in der PBMC-Kultur bei 13%. Die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) wiesen mit ca. 1% in der Vollblutkultur und 8% in der PBMC-Kultur die geringste Apoptoserate auf. Nach 24 Stunden in Kultur lagen die Apoptoseraten in den Vollblutkulturen jeweils um ungefähr 2-3% höher, in den PBMC-Kulturen um ca. 10-12% höher, wobei die Monozyten über die Zeit die geringsten Veränderungen zeigten. Die

Konzentration der Zellen im Medium und die Konzentration des Mediums selbst spielte ebenfalls eine entscheidende Rolle für den Erhalt der Zellviabilität. Im Vollblut kann diesen Resultaten nach zu urteilen die Viabilität der Zellen am besten erhalten werden, vermutlich auf Grund von Interaktionen zwischen den verschiedenen Zelltypen mittels Cytokinen (Hodge *et al.*, 2000). Wilkins *et al.* fanden bei unstimulierten PBMC 10,6% frühapoptotische und 4,4% spätapoptotische Zellen nach 48 Stunden in Kultur (Wilkins *et al.*, 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen nicht in Kultur gehalten. Dennoch liefern diese Daten einen Anhaltspunkt, wie hoch die Apoptoseraten von PBMC ungefähr sind. Somit können diese Werte in gewisser Weise für die Richtigkeit der Messung herangezogen werden. Auch konnten die Autoren zeigen, dass die Apoptoserate steigt, je länger die Zellen in Kultur gehalten werden, so dass es eine deutliche Veränderung über die Zeit gibt. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit die PBMC nicht in Kultur gehalten sondern gleich isoliert, gefärbt und dann so schnell wie möglich die Messung durchgeführt, um nicht eine zusätzliche Erhöhung der Apoptoserate *in vitro* zu erhalten. Die PBMC wurden gleich im ersten Schritt per Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation isoliert, allerdings dauerte der gesamte Ansatz nur 95 Minuten, bis die Färbung vollständig durchgeführt war und die Zellen im FACS erfasst werden konnten. Die Zeit war während der Durchführung der Methodik ein wichtiger Einflussfaktor, so dass das Vorgehen bei allen untersuchten Proben identisch war, um Fehler diesbezüglich zu minimieren.

Die Mediane der Apoptoseraten der Normalkollektive in der vorliegenden Arbeit lagen bei 3,84% (Normalkollektiv für Hepatitis B gematcht), 4,41% (Normalkollektiv für Hepatitis C gematcht) und 3,93% (Normalkollektiv für PEP gematcht), so dass die Größenordnung die Beobachtungen z. B. von Hodge G *et al.* bestätigt. Die Zeit, in der die Zellen isoliert in verschiedenen künstlichen Medien vorlagen bevor die Messung stattfand, lag bei ca. 45 Minuten, die Isolation hat ca. 50 Minuten in Anspruch genommen.

Ein Problem der Annexin V-FITC Färbung besteht darin, dass ein Teil des FITC unkonjugiert vorliegt. Dieses unkonjugierte FITC markiert Eosinophile, so dass diese fälschlicherweise als apoptotische Zellen erkannt werden (Bedner *et al.*, 1999). Bei der PBMC-Isolation werden die Lymphozyten zwar von den Eosinophilen getrennt, somit sollten diese in den Proben nicht mehr vorliegen. Jedoch wäre die sicherste Methode,

einen derartigen Fehler ganz zu vermeiden, die Lymphozyten per FACS zu sortieren. Dies war mit dem verwendeten BD FACScan jedoch nicht möglich.

Lugli et al. versuchten die bei der Apoptose ablaufenden Vorgänge mit Hilfe eines polychromatischen Ansatzes für die Durchflusszytometrie weiter aufzuklären. Hierbei wurden alle in der hier diskutierten Untersuchung verwendeten Färbungen benutzt. Sie färbten die Zellen gleichzeitig mit JC-1 um das MMP zu bestimmen, mit PI um tote bzw. spätapoptotische Zellen zu detektieren, Annexin V, um die Frühapoptotischen zu detektieren und mit MitoTracker Deep Red, um die Mitochondrienmasse zu bestimmen. Zur Apoptoseinduktion benutzten sie Flavonoid Quercetin, Doxorubicin, Daunomycin, Stavudin und Staurosporin, als Zelltypen dienten Monozyten vom Typ U937 und HL60, Lymphozyten vom Typ A301 und CEM und nicht weiter spezifizierte PBMC. Sie entdeckten dabei 3 Zellpopulationen mit verschiedenen MMPs, und zwar gesunde Zellen mit hohem MMP, normalem DNA-Gehalt, hoher Mitochondrienmasse, die PI- und Annexin V-negativ waren. Die nächste Population mit intermediärem MMP und normalem DNA-Gehalt, aber mit veränderten physikalischen Parametern, die für apoptotische Zellen typisch sind und niedriger mitochondrialer Masse, von denen die meisten PI-positiv und Annexin V-positiv waren. Die dritte Population waren Zellen mit zusammengebrochenem MMP, niedrigerer Mitochondrienmasse, die PI- und Annexin V-positiv waren und von denen die Hälfte einen verminderten DNA-Gehalt aufwies. Somit scheinen sich diese Färbungsmethoden als zuverlässig erwiesen zu haben (Lugli *et al.*, 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurden zusätzlich mit den selben Einstellungen am FACS mit jeder Annexin-V-Messung auch ungefärbte Zellen als Negativkontrollen mit untersucht um zu zeigen, dass die Proben sauber waren und die Zellen nicht von sich aus eine Fluoreszenz aufweisen, die zu falschen Messungen geführt hätte. Der Anteil an detektierten Ereignissen im rechten unteren Quadranten des Plots (Annexin-V-positiv, PI-negativ) lag bei den ungefärbten Zellen zwischen 0,00% und 0,04%, der Anteil der Events im rechten oberen Quadranten (Annexin-V-positiv, PI-positiv) lag stets zwischen 0,00% und 0,27%. Demnach wurden in den Dot-Plots praktisch nur gefärbte Zellen als apoptotisch bzw. nekrotisch registriert.

Für die Überprüfung der JC-1-Färbung wurden bei jeder Messung Positivkontrollen durchgeführt. Hierzu wurde FCCP verwendet, um den Protonengradienten über der

inneren Mitochondrienmembran zu verringern und somit das MMP zu erniedrigen (siehe Abschnitt Methodik III.3.4.2). In den durchgeführten Messungen sah man nach Zugabe von FCCP bei allen Proben eine beträchtliche Abnahme der Fluoreszenz in FL-2 und eine Zunahme in FL-1, was auf das vermehrte Vorliegen von JC-1-Monomeren zurückzuführen ist. Somit nahm das MMP nachweislich ab. Dies weist darauf hin, dass mit der JC-1-Färbung das MMP zuverlässig gemessen wird und die isolierten Zellen vital waren, da sie mit einer starken Abnahme des MMP reagierten. Diese Positivkontrolle wurde zur Validierung bei jeder Messung durchgeführt. Zudem erfolgte bei dem PEP-Kollektiv, das Truvada® / Kaletra® erhielt, noch eine Auswertung des MMP über die Angabe des prozentualen Anteils an PBMC mit erniedrigtem MMP. Dies ist ein gängiges Auswertungsverfahren für die JC-1 Färbung und führte zu einem übereinstimmenden Ergebnis mit der Auswertung durch den Quotienten FL-2/FL-1. Dies zeigt nochmals die Robustheit der Ergebnisse unabhängig von der Auswertemethode.

V.6.3 Diskussion der Auswertung

V.6.3.1 Verwendung nicht-parametrischer Teste bei den Hepatitis-Kollektiven

Durch die insgesamt kleinen Fallzahlen wurde auf einen Test auf Normalverteilung sämtlicher ermittelter Parameter verzichtet und alles pauschal als nicht normalverteilt angesehen, so dass nur nicht-parametrische Tests zur Auswertung verwendet wurden. Statt Mittelwert +/- Standardabweichung wurde stets der Median und die Spannweite angegeben. Dies hat zwar einerseits den Nachteil, dass die Teste eine geringere Power haben. Der Vorteil ist andererseits, dass die Auswertung strenger ist und signifikante Ergebnisse dafür mit höherer Sicherheit signifikant sind. Darüber hinaus ist die Auswertung auf diese Art einheitlich.

V.6.3.2 PEP-Kollektiv

Einige Patienten erschienen nicht zu den vereinbarten Kontrollterminen, andere bekamen die Medikamente in anderen Einrichtungen, wie z. B. einer Notaufnahme und

kamen dann nur zu bestimmten Kontrollterminen in die Infektionsambulanz, wo sie dann Blut für die Studie abgeben konnten, andere wiederum konnten nicht bis zur 3-Monats-Kontrolle nachverfolgt werden. Daher gab es viele fehlende Werte, wodurch die statistische Auswertung kompliziert wurde.

Um alle gemessenen Werte bei der Auswertung berücksichtigen zu können, wurde für die jeweiligen Zeitpunkte die Anzahl gemessener Werte angegeben und alle vorliegenden Werte zu allen Zeitpunkten mit Hilfe einer mixed model Analyse mittels PROC MIXED in SAS[®] 9.2 ausgewertet. Dieser Test ermöglicht die ideale Auswertung dieser Daten, bei denen wiederholte Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten bei unvollständigem Datensatz vorliegen. Hierbei können auch die Patienten, von denen es keine vollständigen Daten zu allen Zeitpunkten gibt, mit ausgewertet werden (Wolfinger & Chang). Dies ist möglich, da es sich um ein wahrscheinlichkeitsbasiertes Modell handelt. Bei der Berechnung der Baseline bis zur 4-Wochen-Kontrolle wurden die genauen Messzeitpunkte in Tagen nach PEP-Beginn berücksichtigt und nicht nur die vereinfachte Annahme von 4 gleichen Messzeitpunkten, was die Datenlage genauer beschreibt. Beim Vergleich der 4-Wochen mit der 3-Monats-Kontrolle wurden nur diese beiden Zeitpunkte und nicht der jeweils exakte Zeitpunkt der Messung in Tagen verwendet, da im Gegensatz zu den ersten 4 Wochen nach 2 bis 4 Monaten von einem plateauartigen Verlauf ausgegangen wurde, so dass der exakte Tag eine untergeordnete Rolle spielt. Bei Berücksichtigung des Alters und des Geschlechts im Modell bezüglich der Abnahme des MMP bzw. der Änderung der Apoptoserate über die Zeit ergab sich kein wesentlicher Unterschied für die Schätzer der den Zeitpunkt beschreibenden Koeffizienten, so dass diese Parameter als Störgrößen ausgeschlossen und daher nicht in das Modell aufgenommen wurden.

V.7 Schlussfolgerung

Dies ist die erste Arbeit, in der der Einfluss von Tenofovir, Emtricitabin und Lopinavir/Ritonavir auf des MMP von PBMC nicht HIV-infizierter Personen untersucht wurde. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass bei einer 4-wöchigen Einnahme dieser Substanzen im Rahmen einer HIV-PEP zu einer signifikanten Abnahme des MMP von PBMC kommt. Diese MMP-Abnahme war nach Beendigung der PEP

reversibel. Auf die Apoptoserate konnte kein Einfluss festgestellt werden. Diese Ergebnisse sind von Relevanz, da sich die bei der PEP eingesetzten neueren NRTI in bisherigen Studien weniger mitochondrientoxisch zeigten, als die der alten Generation (z.B. Stavudin, Zidovudin, Didanosin) (Venhoff *et al.*, 2007, Vidal *et al.*, 2006, Caron *et al.*, 2008, Birkus *et al.*, 2002, Miró *et al.*, 2003, McComsey *et al.*, 2005, Ananworanich *et al.*, 2008, Miró *et al.*, 2005, López *et al.*, 2006). Dieses Ergebnis hat vermutlich keinen bedeutenden klinischen Effekt auf Patienten, die eine zeitlich begrenzte PEP erhalten, da diese keine klinischen Nebenwirkungen zeigten, die typischerweise mit mitochondrialer Dysfunktion assoziiert werden. Es könnte aber bei der Jahrzehnte lang durchgeführten HIV-Therapie eine Rolle spielen.

Im Rahmen der chronischen HBV-Monoinfektion war weder das MMP, noch die Apoptoserate in PBMC gegenüber gesunden Personen verändert. Auch unter Therapie der HBV-Infektion mit Nucleosidanaloga ließ sich kein Einfluss auf diese Parameter nachweisen. Da jedoch die Patienten mit völlig unterschiedlichen Substanzen behandelt wurden und die Fallzahl gering war, ist eine sichere Aussage bezüglich des Effekts einzelner Substanzen an dieser Stelle nicht möglich. Hier sind weitere Studien wünschenswert, da die Ergebnisse des PEP-Kollektivs auch für die Betrachtung des mitochondrientoxischen Potentials der Hepatitis B-Therapie von Relevanz sind. Tenofovir und Emtricitabin sind beispielsweise auch bei der HBV-Therapie wirksam und einsetzbar, auch als Kombination (Berg *et al.*, 2010). Die Nucleosidanaloga der alten Generation, von denen ein starkes mitochondrientoxisches Potential bekannt ist, wurden hingegen nie zur Therapie der chronischen Hepatitis B-Infektion eingesetzt, so dass man bisher davon ausging, dass die Therapieregime der HBV-Infektion keine oder nur eine geringe mitochondriale Toxizität aufweisen. Die Ergebnisse des therapierten HBV-Kollektivs und des PEP-Kollektivs stehen dabei nicht im Widerspruch, da nur ein HBV-Patient Tenofovir (in Kombination mit Entecavir) erhielt, so dass bei diesem Kollektiv keine Aussage bezüglich der Wirkung von Tenofovir auf das MMP in PBMC gemacht werden kann. Es wäre möglich, dass bei einer Untersuchung mehrerer HBV-Patienten unter Therapie mit Tenofovir oder der Kombination Tenofovir/Emtricitabin (Berg *et al.*, 2010) eine Verminderung des MMP in PBMC beobachtet werden könnte. Alternativ beruht das mitochondrientoxische Potential dieser Substanzen auf der Kombination mit Lopinavir/Ritonavir.

Bei chronischer Hepatitis C-Infektion konnte ein signifikant niedrigeres MMP gegenüber gesunden Personen festgestellt werden. Jedoch zeigte sich beim Vergleich von

untherapierten HCV-Patienten bei PBMC kein MMP-Unterschied zu Gesunden. Das MMP unter Interferon- α - und Ribavirintherapie lag im statistischen Trend niedriger als bei gesunden Personen und bei untherapierten HCV-Patienten, so dass die beobachtete MMP-Erniedrigung der PBMC am ehesten auf die Therapie zurückzuführen ist.

Mitochondriale Dysfunktion ist ein bedeutendes Thema, vor allem bei chronischen Virusinfektionen, da es sich um einen wichtigen pathophysiologischen Mechanismus dieser Erkrankungen zu handeln scheint. Daher ist es wichtig zu differenzieren, welche Einflüsse das Virus selbst nimmt und welche Veränderungen an den Mitochondrien durch die Therapie verursacht werden. Da die hier vorgestellten Untersuchungen durch die geringe Fallzahl limitiert waren und um diese Einflüsse weiter zu differenzieren, sind zusätzliche Untersuchungen mit größerer Fallzahl an untherapierten und therapierten HBV- und HCV-infizierten Personen notwendig. Vor allem sollten mehrere HBV-Patienten mit dem jeweils gleichen Therapieregime untersucht werden, um Aussagen bezüglich des Einflusses der einzelnen Nucleosidanaloga, die bei dieser Infektion eingesetzt werden, treffen zu können.

VI Zusammenfassung

Mitochondriale Dysfunktion ist ein lange bekanntes Problem bei verschiedenen Virusinfektionen, unter anderem mit dem HI-Virus und den Hepatitis B- und C-Viren, wo ein Einfluss zumindest bei in vitro Untersuchungen nachgewiesen wurde. Auch bei der Einnahme antiviraler Medikamente zur Therapie dieser Infektionen wurden mitochondrientoxische Effekte beobachtet. Vor allem ältere Nucleosidanaloga wie Stavudin, Zidovudin und Didanosin gelten sowohl in Zellkulturen, als auch bei HIV-infizierten Patienten als mitochondrientoxisch. Neuere Nucleosidanaloga wie Tenofovir, Emtricitabin, Abacavir und Lamivudin, die zum Teil auch bei der Therapie der Hepatitis B-Infektion eingesetzt werden, scheinen weniger toxisch zu sein. Viele bei der HIV-Therapie beobachtete klinische Nebenwirkungen wie periphere Neuropathie, Pankreatitis, Hyperlactatämie, Lactazidose, Erhöhung der Creatinkinase, fulminantes Leberversagen und die Lipodystrophie sind mit einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials in verschiedenen Zelltypen, jedoch vor allem in PBMC assoziiert. Allerdings führt auch die HIV-Infektion per se bei Patienten ohne HAART zu einer Verminderung des mitochondrialen Membranpotentials. Bei der Infektion mit Hepatitis B- bzw. Hepatitis C-Virus konnten in Zellkulturen und in Hepatozyten wiederholt mitochondrientoxische Effekte nachgewiesen werden, ohne dass dieser Effekt auf PBMC an Patienten untersucht wurde. Beim Hepatitis B-Virus ist davon auszugehen, dass diese Effekte durch das HBx-Protein hervorgerufen werden, wohingegen der Mechanismus bei Hepatitis C auf das Core-Protein und das virale NS5a-Protein zurückzuführen zu sein scheint. Die Mitochondrientoxizität, die diese Viren auf die infizierten Zellen ausüben, könnte eine Rolle bei der Entstehung der Leberzirrhose und des hepatozellulären Carcinoms spielen, die bei den chronisch verlaufenden Virushepatitiden bei einigen Patienten im natürlichen Krankheitsverlauf auftreten und die es durch eine rechtzeitig durchgeführte Therapie zu verhindern gilt. Auch wurde bisher der Einfluss durch Interferon- α bzw. neuere Nucleosidanaloga in der Therapie der Virushepatitiden auf die Mitochondrien der PBMC bei monoinfizierten HBV- oder HCV-Patienten nicht untersucht.

Um den Einfluss einer antiretroviralen Therapie alleine ohne die HIV-Infektion und den Einfluss der Hepatitis B- und C-Viren bzw. deren Therapie auf die Mitochondrien in PBMC zu untersuchen, wurde bei Personen, die eine HIV-Postexpositionsprophylaxe

(PEP) erhielten und sich nicht mit dem HI-Virus angesteckt hatten und bei Patienten mit chronischer Hepatitis B oder chronischer Hepatitis C jeweils ohne bzw. unter Therapie das MMP und die Apoptoserate in PBMC ohne in vitro-Stimulation untersucht.

Rekrutiert wurden die Patienten in der Infektionsambulanz und Tagesklinik der Medizinischen Poliklinik, Campus Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München im Zeitraum vom 29. Februar 2008 bis zum 01. Oktober 2008. An der Studie nahmen insgesamt 71 Patienten und Probanden teil. 15 untersuchte Patienten hatten eine chronische Hepatitis B Monoinfektion, 15 Patienten mit chronischer Hepatitis C Monoinfektion wurden untersucht, 20 untersuchte Personen nahmen eine HIV-Postexpositionsprophylaxe ein und zum Vergleich der bei den Patienten ermittelten Werte wurden außerdem 21 gesunde Probanden untersucht.

Als Untersuchungsmedium dienten PBMC, die aus Citratblut isoliert wurden. Das MMP wurde per FACS mit Hilfe der JC-1-Färbung ermittelt, zum Nachweis der Apoptoserate und der Anzahl toter Zellen dienten die Annexin-V-Färbung und PI-Gegenfärbung. Hierzu wurden 1×10^6 Zellen mit $10 \mu\text{g/ml}$ JC-1 gefärbt und für 15 Minuten bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und $5\% \text{ CO}_2$ inkubiert. Dann wurden die Zellen dreimal gewaschen und in $400 \mu\text{l}$ PBS resuspendiert. Als zusätzlich durchgeführte Positivkontrollen wurden die so behandelten Zellen mit FCCP vergiftet und eine Minute später gemessen, was zu einem Zusammenbruch des MMP führte. Bei einer Verminderung des MMP verschiebt sich die von JC-1 emittierte Fluoreszenz von Rot (590 nm , Vorliegen von Polymeren) auf Grün (527 nm , Vorliegen von Monomeren). Das rote Signal wird im Kanal FL-2 detektiert, das grüne in FL-1. Ein hohes MMP resultiert in einem starken Signal in FL-2 und einem schwachen Signal in FL-1, somit ist der Quotient der Mediane aus FL-2/FL-1 groß. Wenn das MMP abfällt, fällt auch der Quotient FL-2/FL-1 ab. Die Umrechnung der logarithmisch aufgetragenen Daten erfolgte automatisch durch das Programm CellQuest v. 3.1. Apoptotische PBMC wurden detektiert, in dem 2×10^5 Zellen mit $10 \mu\text{l}$ Annexin V-FITC und $10 \mu\text{l}$ PI gefärbt wurden. Hierbei dienten ungefärbte Zellen als Negativkontrollen. Es wurden jeweils 50.000 Zellen in jeder Probe ausgewertet. Für die Analyse des MMP wurde der Quotient FL-2/FL-1 ermittelt. Im PEP-Kollektiv wurde zusätzlich zur weiteren Validierung der Ergebnisse der prozentuale Anteil an Zellen mit vermindertem MMP ausgewertet. Der Anteil apoptotischer und toter Zellen wurde prozentual angegeben. Die statistische Auswertung bei den Hepatitiskollektiven erfolgte mittels nicht-parametrischer Tests. Der Vergleich der MMPs bzw. des Prozentsatzes apoptotischer Zellen zwischen den Kollektiven erfolgte mittels Mann-Whitney-Tests in

GraphPad Prism 5.00. Das MMP und die Apoptoseraten beim PEP-Kollektiv wurden mittels SAS[®] PROC MIXED Model Analyse für wiederholte Messungen ausgewertet. Hierzu wurde SAS[®] 9.2 verwendet. Alter und Geschlecht wurden als Störfaktoren ausgeschlossen. Zum Ausschluss anderer bekannter Einflussfaktoren auf das MMP wie z. B. Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus oder akute Infektionen wurden bei allen Patienten Routinelaboruntersuchungen mit durchgeführt. Die Patienten wurden bei den Kontrollen zu evtl. aufgetretenen Nebenwirkungen befragt.

Im Vergleich zwischen den MMPs des HBV-Kollektivs mit einem nach Alter und Geschlecht gematchten Normalkollektiv ergab sich kein Unterschied ($p=0,9805$, Mediane FL-2/FL-1 10,69 beim HBV-Kollektiv und 10,34 beim Normalkollektiv), ebenso wenig wie beim Vergleich der Apoptoseraten bei diesen beiden Kollektiven ($p=0,5752$, Mediane FL-2/FL-1 3,87 beim HBV-Kollektiv und 3,84 beim Normalkollektiv). Beim untersuchten HCV-Kollektiv konnte ein signifikant niedrigeres MMP gegenüber einem gematchten Normalkollektiv festgestellt werden ($p=0,0240$, Median FL-2/FL-1 8,55 beim HCV-Kollektiv, 10,14 beim gematchten Normalkollektiv), wobei sich bezüglich der Apoptoseraten kein Unterschied nachweisen ließ ($p=0,5726$, Median FL-2/FL-1 3,85 beim HCV-Kollektiv vs. 4,41 beim gematchten Normalkollektiv). Die MMPs bei den HBV-Patienten unter Therapie (8 Patienten mit Therapie, ein Patient bekam Peg-IFN α , einer Adefovir + Entecavir, einer Tenofovir + Entecavir, 2 bekamen Lamivudin als Monotherapie und 3 nahmen Entecavir als Monotherapie ein) zeigten keinen statistischen Unterschied gegenüber den Untherapierten (7 Patienten, $p=1,0000$, Median FL-2/FL-1 therapiertes Kollektiv 10,84 vs. untherapiertes Kollektiv 9,21), die Apoptoseraten erwiesen sich bei den untherapierten Patienten eher etwas höher ($p=0,0931$, Median FL-2/FL-1 therapiert 2,75 gegenüber 4,40 beim untherapierten Kollektiv). Die MMPs bei den HCV-Patienten unter Therapie ($n=5$) lagen trendweise niedriger als die der Untherapierten ($n=10$, $p=0,0753$, Median FL-2/FL-1 bei den Therapierten 8,18 vs. 9,25 bei den Untherapierten), die Apoptoseraten bei diesen beiden Gruppen unterschieden sich statistisch nicht ($p=0,5476$, Median FL-2/FL-1 3,28 bei der therapierten Gruppe gegenüber 3,91 bei der untherapierten).

Das MMP bei den PEP-Probanden nahm im Lauf der 4-wöchigen Medikamenteneinnahme statistisch signifikant ab ($p=0,0016$ für den linearen Term, $p=0,0195$ für den quadratischen Term der Tage unter PEP). Der Median des FL-2/FL-1-Quotienten betrug 9,34 zur Baseline, sank auf 8,25 zur 2-Wochen-Kontrolle und 7,48

zur 4-Wochen-Kontrolle ab, um zur 3-Monats-Kontrolle wieder auf 9,21 anzusteigen. Für die Apoptoseraten der PBMC ließ sich keine Änderung unter der HAART-Einnahme nachweisen ($p=0,3438$). In der Untergruppe, die eine Kombination aus Emtricitabin, Tenofovir und Lopinavir/Ritonavir erhielt (18 von 20 Patienten), war die Verminderung des MMP ebenfalls statistisch signifikant nachweisbar ($p=0,0015$ für den linearen Term, $p=0,0039$ für den quadratischen Term der Tage unter PEP), der mediane FL-2/FL-1 betrug 9,38 zur Baseline, nach zwei Wochen war der Wert auf 7,86 und nach 4 Wochen auf 7,55 vermindert. Zur 3-Monats-Kontrolle war FL-2/FL-1 wieder auf 9,01 angestiegen. Die Auswertung des prozentualen Anteils der Zellen mit vermindertem MMP erbrachte vergleichbare Resultate mit einem statistisch signifikanten Anstieg des Anteils der Zellen mit erniedrigtem MMP während der vierwöchigen PEP ($p=0,0009$ für den linearen Term, $p=0,018$ für den quadratischen Term der Tage unter PEP). Bei dieser Auswertung war auch die Abnahme des prozentualen Anteils der Zellen mit vermindertem MMP, also der Vergleich zwischen der 4-Wochen- und der 3-Monats-Kontrolle statistisch signifikant ($p=0,047$). Elf Patienten entwickelten Durchfall, einer von ihnen schwer, drei Patienten beklagten vermehrte Abgeschlagenheit, zwei Übelkeit, zwei Meteorismus und einer Kopfschmerzen. Serumcholesterin, LDL und Phosphat waren zur Baseline normal, zeigten jedoch bei einigen Patienten einen Anstieg während der PEP, wobei fünf Patienten Cholesterinwerte über 200 mg/dl bei den 2- und 4-Wochenkontrollen aufwiesen. HDL verminderte sich im Median während der PEP. ALT, AST, aP, γ -GT und CK waren zur Baseline normal und die Mediane blieben während der PEP im Normbereich, wobei ein Patient zur 2-Wochen-Kontrolle und drei Patienten zur 4-Wochen-Kontrolle erhöhte Werte für AST und γ -GT aufwiesen. Zwei Patienten zur 2-Wochen-Kontrolle und drei Patienten zur 4-Wochen-Kontrolle zeigten erhöhte ALT-Werte und fünf Patienten hatten erhöhte CK-Werte bei den 2- und 4-Wochen-Kontrollen. Blutbild, Bilirubin, LDH und Lactat waren bei allen Patienten stets im Normbereich.

Folglich scheint eine chronische Infektion mit dem HB-Virus weder einen Einfluss auf die mitochondriale Funktion der PBMC noch auf die Apoptose dieser Zellen zu haben. Ursache hierfür könnte sein, dass die PBMC gar nicht oder kein großer Anteil dieser Zellen mit dem HBV infiziert ist und das Virus somit keine mitochondrientoxische Wirkung in diesen Zellen ausüben kann bzw. der Effekt in vivo insgesamt gering ist.

Die PBMC von Patienten mit chronischer HCV-Infektion wiesen im Vergleich zu HCV-Negativen ein signifikant niedrigeres MMP auf, allerdings bleibt die Ursache hierfür

unklar. Zum einen könnte die HCV-Infektion selbst dafür verantwortlich sein, zum anderen könnte dies aber auch an den Medikamenten liegen die zur HCV-Therapie eingesetzt werden, vor allem Interferon- α , da Patienten unter Therapie einen Trend zu einem niedrigeren MMP aufwiesen im Vergleich zu den Untherapierten. Beim Vergleich der untherapierten HCV-Patienten mit den gematchten Probanden des Normalkollektivs fiel kein statistischer Unterschied auf, wohingegen der Vergleich der Therapierten mit den gematchten HCV-negativen Probanden einen Trend ergab. Vermutlich konnte auf Grund der geringen Fallzahl bei diesen Unterkollektiven (jeweils $n=5$) kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (die Studie hat an dieser Stelle zu wenig Power). Die HCV-Therapie mit einer Kombination aus Interferon- α und Ribavirin könnte jedoch die Ursache dieser MMP-Verminderung in den PBMC darstellen, was sich auch pathophysiologisch durch die Immunsuppressive Wirkung des Interferons auf Lymphozyten erklären ließ. An dieser Stelle könnten weitere Untersuchungen mit größerer Fallzahl zur weiteren Abklärung des hier beobachteten Phänomens dienen.

Dies ist die erste Studie, in der der Einfluss von Tenofovir und Emtricitabin bei nicht-HIV-Infizierten untersucht wurde. Es zeigte sich eine Verminderung des MMP in PBMC bei den PEP-Patienten über die Zeit der Medikamenteneinnahme, was einen Hinweis darauf darstellt, dass auch neuere NRTI und PI (in der Studie nahmen 18 von 20 Untersuchten eine Kombination aus Emtricitabin, Tenofovir, Lopinavir und Ritonavir ein) zumindest in Kombination ein mitochondrientoxisches Potential aufweisen. Somit sollte man auf die damit verbundenen Nebenwirkungen bei der Verordnung dieser Substanzen stets achten, und nicht nur bei den älteren NRTI Zidovudin, Didanosin oder Stavudin. Ein Patient erhielt eine Kombination aus Lamivudin, Zidovudin, Lopinavir und Ritonavir. Bei diesem Patienten sank das MMP überdurchschnittlich stark ab (FL-2/FL-1 bei der 4-Wochen-Kontrolle betrug 4,65), was am ehesten durch den mitochondrientoxischen Effekt des Zidovudin erklärbar ist. Des Weiteren normalisierten sich die Werte bei den Patienten wieder, die nach 3 Monaten Follow-up nochmals untersucht wurden, was einerseits durch eine mögliche Erholung der Mitochondrien zu erklären wäre, andererseits auch durch den Lymphozytenturnover (60-100 Tage) verursacht sein könnte. Somit ist wahrscheinlicher, dass es sich bei der in anderen Studien beobachteten Verminderung des MMPs bei den PBMC der HIV-Patienten nicht um ein alleine durch das HI-Virus verursachtes Phänomen handelt, sondern auch der bereits vielfach in vitro beobachtete Einfluss der ART-Medikamente in vivo eine entscheidende Rolle zu spielen scheint. Diese Effekte spielen im Rahmen der PEP

vermutlich eine untergeordnete Rolle, da das MMP bei der 3-Monats-Kontrolle bereits wieder normal war und die Patienten klinisch keine für mitochondriale Dysfunktion typischen Symptome zeigten. Allerdings könnten sie bei der dauerhaften Einnahme der neueren NTRI im Rahmen der HIV-Therapie von Relevanz sein. Ein NRTI-freies Regime antiretroviraler Medikamente könnte somit bei der dauerhaften Therapie von Vorteil sein. Hierzu sind weitere Untersuchungen notwendig, die z. B. die Kombination aus dem Integraseinhibitor Raltegravir kombiniert mit einem Proteaseinhibitor auf Mitochondrientoxizität hin prüfen. Die Hepatitis B- und C-Viren per se scheinen nicht den negativen Effekt des HIV auf die Mitochondrien der PBMC infizierter Patienten auszuüben. Jedoch scheint nicht nur die Therapie des HI-Virus, sondern auch die der chronischen Hepatitis C das mitochondriale Membranpotential in PBMC zu vermindern. Eine Alternative zur Therapie mit IFN- α bei den chronischen Virushepatitiden wäre willkommen, da Interferon neben dem eventuellen Einfluss auf die mitochondriale Funktion andere schwere Nebenwirkungen wie Anämie, Thrombopenie und grippeähnliche Symptome hervorruft, die im Alltagsleben des Patienten sehr belastend sein können. Da Tenofovir und Emtricitabin auch als Kombination bei der chronischen Hepatitis B-Infektion wirksam sind und eingesetzt werden können, sind die Ergebnisse des PEP-Kollektivs auch in dieser Hinsicht relevant. Somit könnten bestimmte Regime der Hepatitis B Therapie, die im Rahmen dieser Studie beim HBV-Kollektiv nicht in größerem Umfang untersucht wurden, mitochondrientoxisch sein. An dieser Stelle wären weitere Studien mit größerer Fallzahl wünschenswert.

VII Danksagung

Herzlich danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Johannes Bogner für das Angebot, die Doktorarbeit in der Infektionsambulanz durchführen zu dürfen und für seine direkte Betreuung der Arbeit. Außerdem danken möchte ich Herrn Dr. Ulrich Seybold für die Betreuung, die Verbesserungsvorschläge der Dissertation, die Unterstützung bei der Durchführung der Statistik und der Ausfertigung der Publikation sowie für die Rekrutierung von Patienten. Herrn Thomas Vollbrecht gilt mein herzlicher Dank für die Unterstützung im Labor, das genaue Gegenlesen der Dissertation und für seine Verbesserungsvorschläge. Vielen Dank auch an Frau Julia Sirowej, die mich in allen Lebenslagen unterstützt. Außerdem erwähnen möchte ich Frau Dr. Annette Tischleder, die mich in die Methodik im Labor eingeführt hat. Besonderen Dank verdient haben Frau PD Dr. Rika Draenert, Herr Dr. Julian Claas, Herr Dr. Martin Zechmeister und Herr Dr. Johannes Kütscher, die mich tatkräftig bei der Rekrutierung der Patientin und deren Aufklärung in der Infektionsambulanz unterstützt haben sowie Frau Jasminka Susak und Frau Drena Vucetic, die die Blutentnahmen bei den Studienteilnehmern durchgeführt haben. Zuletzt gilt selbstverständlich mein herzlicher Dank allen Patienten und Probanden, die sich bereit erklärt haben, Blut für diese Studie abzugeben. Ohne die Mitarbeit der hier erwähnten Personen wäre die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

VIII Lebenslauf

Ausbildung

Schule:

09/90 – 06/94	Weststadt-Grundschule	Neu-Ulm
08/94 – 07/03	Schubart-Gymnasium	Ulm
07/03	Abitur, Note 1,3	

Zivildienst:

08/03 – 06/04	Zivildienst im Universitätsklinikum Ulm Oberer Eselsberg, Sozialer Beratungsdienst	Ulm
---------------	---	-----

Studium:

10/04 – 11/10	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität	München
09/06	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note „sehr gut (1,0)“	
11/10	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note „sehr gut (1,0)“	

Famulaturen:

02/07 - 03/07	Laboratoriumsmedizin, Medizinisches Versorgungszentrum Dr. Eberhard & Partner	Dortmund
09/07	Innere Medizin, Endocrinology and Osteoporosis Consultants und Department of Neurology , Presbyterian Hospital	Charlotte, NC, USA

02/08 - 03/08	Innere Medizin, Station 3, Medizinische Poliklinik der LMU	München
02/09 - 03/09	Psychiatrie, Drugs and Alcohol , Concord Hospital	Concord, NSW, Australien

Praktisches Jahr:

08/09 – 10/09	1. Tertial (gesplittet): Allgemein- und Viszeralchirurgie am Chirurgischen Krankenhaus der Universität von Helsinki	Helsinki, Finnland
	Chirurgie am Recanati/Miller Transplantation Institute, Mount Sinai Medical Center	New York, NY, USA
12/09 – 03/10	2. Tertial: Innere Medizin an der Medizinischen Poliklinik, Stationen 1 und 2, Infektionsambulanz und Rheumaeinheit der LMU	München
03/10 – 07/10	3. Tertial: Augenheilkunde an der Augenklinik der LMU	München

Veröffentlichungen:

Poster: J. B. Groener, U. Seybold, J. R. Bogner. Decrease in mitochondrial transmembrane potential in peripheral blood mononuclear cells of HIV-uninfected subjects undergoing HIV post exposure prophylaxis. 10. Kongress für Infektionskrankheiten und Tropenmedizin (KIT), 23. - 26. Juni 2010, Köln (Abstract P152).

Groener JB, Seybold U, Vollbrecht T, Bogner JR. Decrease in mitochondrial transmembrane potential in peripheral blood mononuclear cells of HIV-uninfected subjects undergoing HIV post exposure prophylaxis. AIDS Res Hum Retroviruses. 2011 Feb 13. [Epub ahead of print].

IX Referenzen

- Adrie, C., Bachelet, M., Vayssier-Taussat, M., Russo-Marie, F., Bouchaert, I., Adib-Conquy, M., Cavaillon, J. M., Pinsky, M. R., Dhainaut, J. F. & Polla, B. S. (2001).** Mitochondrial Membrane Potential and Apoptosis Peripheral Blood Monocytes in Severe Human Sepsis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **164**, 389-395.
- Agnello, V., Ábel, G., Elfahal, M., Knight, G. B. & Zhang, Q.-X. (1999).** Hepatitis C virus and other Flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 12766-12771.
- Allain, J. P., Stramer, S. L., Carneiro-Proietti, A. B., Martins, M. L., Lopes da Silva, S. N., Ribeiro, M., Proietti, F. A. & Reesink, H. W. (2009).** Transfusion-transmitted infectious diseases. *Biologicals* **37**, 71-77.
- Ananworanich, J., Nuesch, R., Côté, H. C. F., Kerr, S. J., Hill, A., Jupimai, T., Laopraynak, N., Saenawat, S., Ruxrungtham, K. & Hirschel, B. (2008).** Changes in metabolic toxicity after switching from stavudine/didanosine to tenofovir/lamivudine - A Staccato trial substudy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **61**, 1340-1343.
- Anastos, K., Lu, D., Shi, Q., Tien, P. C., Kaplan, R. C., Hessel, N. A., Cole, S., Vigen, C., Cohen, M., Young, M. & Justman, J. (2007).** Association of serum lipid levels with HIV serostatus, specific antiretroviral agents, and treatment regimens. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (and Human Retrovirology)* **45**, 34-42.
- Anderson, P. L. & Rower, J. E. (2010).** Zidovudine and Lamivudine for HIV Infection. *Clin Med Rev Ther* **2**:a2004.
- Andersson, S. G. E., Zomorodipour, A., Andersson, J. O., Sicheritz-Pontén, T., Alsmark, U. C. M., Podowski, R. M., Näslund, A. K., Eriksson, A.-S., Winkler, H. H. & Kurland, C. G. (1998).** The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* **396**, 133-143.
- Ayoub, W. S. & Keeffe, E. B. (2008).** Review article: current antiviral therapy of chronic hepatitis B. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* **28**, 167-177.
- Ballesteros, A. L., Miró, Ó., López, S., Fuster, D., Videla, S., Martínez, E., Garrabou, G., Salas, A., Côté, H., Tor, J., Rey-Joly, C., Planas, R., Clotet, B. & Tural, C. (2004).** Mitochondrial effects of a 24-week course of pegylated-interferon plus ribavirin in asymptomatic HCV/HIV co-infected patients on long-term treatment with didanosine, stavudine or both. *Antiviral Therapy* **9**, 969-977.
- Banas, B., Kost, B. P. & Goebel, F. D. (2004).** Platelets, a typical source of error in real-time PCR quantification of mitochondrial DNA content in human peripheral blood cells. *European Journal of Medical Research* **9**, 371-377.
- Baré, P., Massud, I., Parodi, C., Belmonte, L., García, G., Nebel, M. C., Corti, M., Pinto, M. T., Bianco, R. P., Bracco, M. M., Campos, R. & Ares, B. R. (2005).** Continuous release of hepatitis C virus (HCV) by peripheral blood mononuclear cells and B-lymphoblastoid cell-line cultures derived from HCV-infected patients. *Journal of General Virology* **86**, 1717-1727.
- Barría, M. I., Vera-Otarola, J., León, Ú., Vollrath, V., Marsac, D., Riquelme, A., López-Lastra, M. & Soza, A. (2008).** Influence of extrahepatic viral infection on the natural history of hepatitis C. *Annals of Hepatology* **7**, 136-143.

- Bedner, E., Halicka, H. D., Cheng, W., Salomon, T., Deptala, A., Gorczyca, W., Melamed, M. R. & Darzynkiewicz, Z. (1999).** High affinity binding of fluorescein isothiocyanate to eosinophils detected by laser scanning cytometry: a potential source of error in analysis of blood samples utilizing fluorescein-conjugated reagents in flow cytometry. *Cytometry* **36**, 77-82.
- Bedossa, P., Dargère, D. & Paradis, V. (2003).** Sampling Variability of Liver Fibrosis in Chronic Hepatitis C. *Hepatology* **38**, 1449-1457.
- Beltrami, E. M., Williams, I. T., Shapiro, C. N. & Chamberland, M. E. (2000).** Risk and Management of Blood-Borne Infections in Health Care Workers. *Clinical Microbiology Reviews* **13**, 385-407.
- Berg, T., Marcellin, P., Zoulim, F., Moller, B., Trinh, H., Chan, S., Suarez, E., Lavocat, F., Snow-Lampart, A., Frederick, D., Sorbel, J., Borroto-Esoda, K., Oldach, D. & Rousseau, F. (2010).** Tenofovir is effective alone or with emtricitabine in adefovir-treated patients with chronic-hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* **139**, 1207-1217.
- Bertoletti, A., Maini, M. K. & Ferrari, C. (2010).** The host-pathogen interaction during HBV infection: immunological controversies. *Antivir Ther* **15 Suppl 3**, 15-24.
- Betteridge, D. J. (2000).** What Is Oxidative Stress? *Metabolism* **49**, 3-8.
- Birkus, G., Hitchcock, M. J. M. & Cihlar, T. (2002).** Assessment of Mitochondrial Toxicity in Human Cells Treated with Tenofovir: Comparison with Other Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**, 716-723.
- Blum, H. E., Stowring, L., Figus, A., Montgomery, C. K., Haase, A. T. & Vyas, G. N. (1983).** Detection of hepatitis B virus DNA in hepatocytes, bile duct epithelium, and vascular elements by in situ hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **80**, 6685-6688.
- Bonis, P. A. L., Tong, M. J., Blatt, L. M., Conrad, A. & Griffith, J. L. (1999).** A Predictive Model for the Development of Hepatocellular Carcinoma, Liver Failure, or Liver Transplantation for Patients Presenting to Clinic With Chronic Hepatitis C. *The American Journal of Gastroenterology* **94**, 1605-1612.
- Brinkman, K., ter Hofstede, H. J. M., Burger, D. M., Smeitink, J. A. M. & Koopmans, P. P. (1998).** Adverse effects of reverse transcriptase inhibitors: mitochondrial toxicity as common pathway. *AIDS* **12**, 1735-1744.
- Cacoub, P., Renou, C., Rosenthal, E., Cohen, P., Louri, I., Loustaud-Ratti, V., Yamamoto, A. M., Camproux, A. C., Hausfater, P., Musset, L., Veyssier, P., Raguin, G. & Piette, J. C. (2000).** Extrahepatic Manifestations Associated with Hepatitis C Virus Infection: A Prospective Multicenter Study of 321 Patients. *Medicine* **79**, 47-56.
- Cacoub, P. & Saadoun, D. (2008).** Hepatitis C Virus Infection Induced Vasculitis. *Clinical reviews in Allergy & Immunology* **35**, 30-39.
- Calza, L., Manfredi, R., Farneti, B. & Chiodo, F. (2003).** Incidence of hyperlipidaemia in a cohort of 212 HIV-infected patients receiving a protease inhibitor-based antiretroviral therapy. *International Journal of Antimicrobial Agents* **22**, 54-59.
- Cardo, D. M., Culver, D. H., Ciesielski, C. A., Srivastava, P. U., Marcus, R., Abiteboul, D., Heptonstall, J., Path, M. R. C., Ippolito, G., Lot, F., McKibben, P. S. & Bell, D. M. (1997).** A Case-Control Study of HIV Seroconversion in Health Care Workers After Percutaneous Exposure. *The New England Journal of Medicine* **337**, 1485-1490.
- Carman, W. F., Zanetti, A. R., Karayiannis, P., Waters, J., Manzillo, G., Tanzi, E., Zuckerman, A. J. & Thomas, H. C. (1990).** Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *The Lancet* **336**, 325-329.

- Caron, M., Auclair, M., Vissian, A., Vigouroux, C. & Capeau, J. (2008).** Contribution of mitochondrial dysfunction and oxidative stress to cellular premature senescence induced by antiretroviral thymidine analogues. *Antiviral Therapy* **13**, 27-38.
- Carson, D. A. & Ribeiro, J. M. (1993).** Apoptosis and disease. *The Lancet* **341**, 1251-1254.
- Cartron, P.-F., Bellot, G., Oliver, L., Grandier-Vazeille, X., Manon, S. & Vallette, F. M. (2008).** Bax inserts into the mitochondrial outer membrane by different mechanisms. *FEBS Letters* **582**, 3045-3051.
- Casademont, J., Garrabou, G., Miró, ò., López, S., Pons, A., Bernardo, M. & Cardellach, F. (2007).** Neuroleptic Treatment Effect on Mitochondrial Electron Transport Chain - Peripheral Blood Mononuclear Cells Analysis in Psychotic Patients. *Journal of Clinical Psychopharmacology* **27**, 284-288.
- Cassart, D., Fett, T., Sarlet, M., Baise, E., Coignoul, F. & Desmecht, D. (2007).** Flow cytometric probing of mitochondrial function in equine peripheral blood mononuclear cells. *BMC Veterinary Research* **3**, 25.
- Casula, M., Bosboom-Dobbelaer, I., Smolders, K., Otto, S., Bakker, M., Baar, M. P. d., Reiss, P. & Ronde, A. d. (2005).** Infection with HIV-1 Induces a Decrease in mtDNA. *The Journal of Infectious Diseases* **191**, 1468–1471.
- CDC (1996).** Case-Control Study of HIV Seroconversion in Health-Care Workers After Percutaneous Exposure to HIV-Infected Blood -- France, United Kingdom, and United States, January 1988-August 1994. *JAMA* **275**, 274-275.
- Chang, T. T., Young, K. C., Yang, Y. J., Lei, H. Y. & Wu, H. L. (1996).** Hepatitis C Virus RNA in Peripheral Blood Mononuclear Cells: Comparing Acute and Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Hepatology* **23**, 977-981.
- Chaudhari, A. A., Seol, J.-W., Kang, S.-J. & Park, S.-Y. (2008).** Mitochondrial Transmembrane Potential and Reactive Oxygen Species Generation Regulate the Enhanced Effect of CCCP on TRAIL-Induced SNU-638 Cell Apoptosis. *Journal of Veterinary Medical Sciences* **70**, 537-542.
- Chen, C. J., Yang, H. I., Su, J., Jen, C. L., You, S. L., Lu, S. N., Huang, G. T. & Illoeje, U. H. (2006).** Risk of Hepatocellular Carcinoma Across a Biological Gradient of Serum Hepatitis B Virus DNA Level. *Journal of the American Medical Association* **295**, 65-73.
- Cherrington, J. M., Allen, S. J., McKee, B. H. & Chen, M. S. (1994).** Kinetic Analysis Of The Interaction Between The Diphosphate Of (S)-l-(3-Hydroxy-2-Phosphonylmethoxypropyl)Cytosine, ddCTP, AZTIP, And FIAUTP With Human DNA Polymerases/3 And 7. *Biochemical Pharmacology* **48**, 1986-1988.
- Cherry, C. L., Lal, L. & Wesselingh, S. L. (2005).** Mitochondrial toxicity of nucleoside analogues: mechanism, monitoring and management. *Sexual Health* **2**, 1-11.
- Chiappini, F., Teicher, E., Saffroy, R., Pham, P., Falissard, B., Barrier, A., Chevalier, S., Debuire, B., Vittecoq, D. & Lemoine, A. (2004).** Prospective evaluation of blood concentration of mitochondrial DNA as a marker of toxicity in 157 consecutively recruited untreated or HAART-treated HIV-positive patients. *Laboratory Investigation* **84**, 908–914.
- Choi, J., Liu, R.-M., Kundu, R. K., Sangiorgi, F., Wui, W., Maxson, R. & Forman, H. J. (2000).** Molecular Mechanism of Decreased Glutathione Content in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Tat-transgenic Mice. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 3693-3698.
- Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W. & Houghton, M. (1989).** Isolation of a cDNA Clone Derived from a Blood-Borne Non-A, Non-B Viral Hepatitis Genome. *Science* **244**, 359-362.

- Chowdhury, I., Tharakan, B. & Bhat, G. K. (2008).** Caspases — An update. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* **151**, 10-27.
- Connolly, B. S., Feigenbaum, A. S., Robinson, B. H., Dipchand, A. I., Simon, D. K. & Tarnopolsky, M. A. (2010).** MELAS syndrome, cardiomyopathy, rhabdomyolysis, and autism associated with the A3260G mitochondrial DNA mutation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **402**, 443-447.
- Cossarizza, A. (2003).** Tests for mitochondrial function and DNA: potentials and pitfalls. *Current Opinion in Infectious Diseases* **16**, 5-10.
- Cossarizza, A., Baccarani-Contri, M., Kalashnikova, G. & Franceschi, C. (1993).** A New Method for the Cytofluorimetric Analysis of Mitochondrial Membrane Potential Using the J-Aggregate Forming Lipophilic Cation 5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-Tetraethylbenzimidazolcarbocyanine Iodide (JC-1). *Biochemical and Biophysical Research Communications* **197**, 40-45.
- Cossarizza, A., Mussini, C., Mongiardo, N., Borghi, V., Sabbatini, A., De Rienzo, B. & Franceschi, C. (1997).** Mitochondria alterations and dramatic tendency to undergo apoptosis in peripheral blood lymphocytes during acute HIV syndrome. *AIDS* **11**, 19-26.
- Cossarizza, A., Pinti, M., Moretti, L., Bricalli, D., Bianchi, R., Troiano, L., Fernandez, M. G., Balli, F., Brambilla, P., Mussini, C. & Viganò, A. (2002).** Mitochondrial Functionality and Mitochondrial DNA Content in Lymphocytes of Vertically Infected Human Immunodeficiency Virus-Positive Children with Highly Active Antiretroviral Therapy-Related Lipodystrophy. *The Journal of Infectious Diseases* **185**, 299-305.
- Cossarizza, A., Riva, A., Pinti, M., Ammannato, S., Fedeli, P., Mussini, C., Esposito, R. & Galli, M. (2003).** Increased mitochondrial DNA content in peripheral blood lymphocytes from HIV-infected patients with lipodystrophy. *Antiviral Therapy* **8**, 315-321.
- Côté, H. C. F., Raboud, J., Bitnun, A., Alimenti, A., Money, D. M., Maan, E., Costei, A., Gadawski, I., Diong, C., Read, S., Shen, S., Harrigan, P. R., Burdge, D. R., King, S. M. & Forbes, J. C. (2008).** Perinatal Exposure to Antiretroviral Therapy is Associated with Increased Blood Mitochondrial DNA Levels and Decreased Mitochondrial Gene Expression in Infants. *Journal of Infectious Diseases* **198**, 851-859.
- Côté, H. C. F., Yip, B., Asselin, J. J., Chan, J. W., Hogg, R. S., Harrigan, P. R., O'Shaughnessy, M. V. & Montaner, J. S. G. (2003).** Mitochondrial:Nuclear DNA Ratios in Peripheral Blood Cells from Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Infected Patients Who Received Selected HIV Antiretroviral Drug Regimens. *Journal of Infectious Diseases* **187**, 1972-1976.
- Dane, D. S., Cameron, C. H. & Briggs, M. (1970).** Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *The Lancet* **295**, 695-698.
- Darzynkiewicz, Z., Crissman, H. A. & Robinson, J. P. (2000).** *Cytometry*: Academic Press.
- Das, A. & Maini, M. K. (2010).** Innate and adaptive immune responses in hepatitis B virus infection. *Digestive Diseases* **28**, 126-132.
- Datenblatt der Biochrom AG Biocoll.**
http://www.biochrom.de/fileadmin/user_upload/service/produktinformation/deutsch/BC_Katalog_72_73_Biocollpdf.
- Davis, G. L. & Lau, J. Y. N. (1997).** Factors Predictive of a Beneficial Response to Therapy of Hepatitis C. *Hepatology* **26**, 122S-127S.
- Day, B. J. & Lewis, W. (2004).** Oxidative Stress in NRTI-Induced Toxicity. *Cardiovascular Toxicology* **4**, 207-216.

- De Franceschi, L., Fattovich, G., Turrini, F., Ayi, K., Brugnara, C., Manzato, F., Noventa, F., Stanzial, A. M., Solero, P. & Corrocher, R. (2000).** Hemolytic Anemia Induced by Ribavirin Therapy in Patients With Chronic Hepatitis C Virus Infection: Role of Membrane Oxidative Damage. *Hepatology* **31**, 997-1004.
- de Mendoza, C., Sanchez-Conde, M., Ribera, E., Domingo, P. & Soriano, V. (2004).** Could Mitochondrial DNA Quantitation Be A Surrogate Marker for Drug Mitochondrial Toxicity? *AIDS Reviews* **6**, 169-180.
- de Mendoza, C., Sánchez-Conde, M., Timmermans, E., Buitelaar, M., de Baar, M. P., Gonzalez-Lahoz, J. & Soriano, V. (2005).** Mitochondrial DNA depletion in HIV-infected patients is more pronounced with chronic hepatitis C and enhanced following treatment with pegylated interferon plus ribavirin. *Antiviral Therapy* **10**, 557-561.
- Dejean, L. M., Martinez-Caballero, S., Guo, L., Hughes, C., Tejjido, O., Ducret, T., Ichas, F., Korsmeyer, S. J., Antonsson, B., Jonas, E. A. & Kinnally, K. W. (2005).** Oligomeric Bax Is a Component of the Putative Cytochrome c Release Channel MAC, Mitochondrial Apoptosis-induced Channel. *Molecular Biology of the Cell* **16**, 2424-2432.
- Dell'Anna, M. L., Urbanelli, S., Mastrofrancesco, A., Camera, E., Iacovelli, P., Leone, G., Manni, P., D'Ischia, M. & Picardo, M. (2003).** Alterations of Mitochondria in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Vitiligo Patients. *Pigment Cell Res* **16**, 553–559.
- Deng, L., Adachi, T., Kitayama, K., Bungyoku, Y., Kitazawa, S., Ishido, S., Shoji, I. & Hotta, H. (2008).** Hepatitis C Virus Infection Induces Apoptosis through a Bax-triggered, Mitochondria-mediated, Caspase-3-dependent Pathway. *Journal of Virological Infections*.
- Deterding, K., Constantinescu, I., Nedelcu, F. D., Gervain, J., Nemecek, V., Srtunecy, O., Vince, A., Grgurevic, I., Bielawski, K. P., Zalewska, M., Bock, T., Ambrozaitis, A., Stanczak, J., Takács, M., Chulanov, V., Slusarczyk, J., Drazd'áková, M., Wiegand, J., Cornberg, M., Manns, M. P. & Wedemeyer, H. (2008).** Prevalence of HBV Genotypes in Central and Eastern Europe. *Journal of Medical Virology* **80**, 1707–1711.
- Deutsch-Österreichische Empfehlungen (2008).** Postexpositionelle Prophylaxe der HIV-Infektion.
- Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselerkrankungen (2007).** Prophylaxe, Diagnostik und Verlauf der Hepatitis-B-Virus-(HBV)-Infektion. *AWMF Leitlinie*.
- Deutsche Hochdruckliga e.V. DHL® (2008).** Leitlinien zur Behandlung der arteriellen Hypertonie. http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/046-001_S2_Behandlung_der_arteriellen_Hypertonie_06-2008_06-2013pdf.
- Diamond, D. L., Jacobs, J. M., Paeper, B., Proll, S. C., Gritsenko, M. A., Carithers Jr., R. L., Larson, A. M., Yeh, M. M., Camp II, D. G., Smith, R. D. & Katze, M. G. (2007).** Proteomic Profiling of Human Liver Biopsies: Hepatitis C Virus–Induced Fibrosis and Mitochondrial Dysfunction. *Hepatology* **46**, 649-657.
- Ding, J. L. & Oon, C. J. (1984).** Detection of HBeAg in the lymphocytes of sero-HBeAg negative patients with chronic hepatitis B and primary hepatocellular carcinoma (nur Abstract). *Cytobios* **39**, 29-33.
- Dolce, V., Fiermonte, G., Runswick, M. J., Palmieri, F. & Walker, J. E. (2001).** The human mitochondrial deoxynucleotide carrier and its role in the toxicity of nucleoside antivirals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 2284-2288.

- Dustin, L. B. & Rice, C. M. (2007).** Flying Under the Radar: The Immunobiology of Hepatitis C. *The Annual Review of Immunology* **25**, 71-99.
- El-Serag, H. B., Hampel, H., Yeh, C. & Rabeneck, L. (2002).** Extrahepatic Manifestations of Hepatitis C Among United States Male Veterans. *Hepatology* **36**, 1439-1445.
- European AIDS Clinical Society (2011).** Guideline - Clinical Management and Treatment of HIV Infected Adults in Europe.
- Finsterer, J. (2011).** Parkinson's syndrome and Parkinson's disease in mitochondrial disorders. *Movement Disorders* doi: **10.1002/mds.23651**.
- Fleischer, R., Boxwell, D. & Sherman, K. E. (2004).** Nucleoside Analogues and Mitochondrial Toxicity. *Clinical Infectious Diseases* **38**, 79-80.
- Foli, A., Benvenutoa, F., Piccinini, G., Bareggi, A., Cossarizzab, A., Lisziewicz, J. & Lori, F. (2001).** Direct analysis of mitochondrial toxicity of antiretroviral drugs. *AIDS* **15**, 1687-1694.
- Fontana, R. J. (2003).** Management of Patients with Decompensated HBV Cirrhosis. *Seminars in Liver Disease* **23**, 89-100.
- Fried, M. W., Shiffman, M. L., Reddy, K. R., Smith, C., Marinos, G., Goncales Jr., F. L., Häussinger, D., Diago, M., Carosi, G., Dhumeaux, D., Craxi, A., Lin, A., Hoffman, J. & Yu, J. (2002).** Peginterferon Alfa-2a Plus Ribavirin For Chronic Hepatitis C Virus Infection. *New England Journal of Medicine* **347**, 975-982.
- Fung, J., Lung, L. C. & Yuen, M. F. (2008).** New paradigms for the treatment of chronic hepatitis B. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **23**, 1182-1192.
- Gane, E. (2011).** Future hepatitis C virus treatment: interferon-sparing combinations. *Liver Int* **31 Suppl 1**, 62-67.
- Ganem, D. (1991).** Assembly of hepadnaviral virions and subviral particles. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **168**, 61-83.
- Ganem, D. & Prince, A. M. (2004).** Hepatitis B Virus Infection - Natural History and Clinical Consequences. *The New England Journal of Medicine* **350**, 1118-1129.
- Garcia-Garcia, I., Gonzalez-Delgado, C. A., Valenzuela-Silva, C. M., Diaz-Machado, A., Cruz-Diaz, M., Nodarse-Cuni, H., Perez-Perez, O., Bermudez-Badell, C. H., Ferrero-Bibilonia, J., Paez-Meireles, R., Bello-Rivero, I., Castro-Odio, F. R. & Lopez-Saura, P. A. (2010).** Pharmacokinetic and pharmacodynamic comparison of two "pegylated" interferon alpha-2 formulations in healthy male volunteers: a randomized, crossover, double-blind study. *BMC Pharmacol* **10**, 15.
- Gerschenson, M., Kim, C., Berzins, B., Taiwo, B., Libutti, D. E., Choi, J., Chen, D., Weinstein, J., Shore, J., da Silva, B., Belsey, E., McComsey, G. A. & Murphy, R. L. (2009).** Mitochondrial function, morphology and metabolic parameters improve after switching from stavudine to a tenofovir-containing regimen. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **63**, 1244-1250.
- Giner, V., Tormos, C., Chaves, F. J., Saez, G. & Redon, J. (2004).** Microalbuminuria and oxidative stress in essential hypertension. *Journal of Internal Medicine* **255**, 588-594.
- Giordano, T. P., Henderson, L., Landgren, O., Chiao, E. Y., Kramer, J. R., El-Serag, H. & Engels, E. A. (2007).** Risk of Non-Hodgkin Lymphoma and Lymphoproliferative Precursor Diseases in US Veterans With Hepatitis C Virus. *Journal of the American Medical Association (JAMA)* **297**, 2010-2017.
- Gish, R. G., Trinh, H., Leung, N., Chan, F. K., Fried, M. W., Wright, T. L., Wang, C., Anderson, J., Mondou, E., Snow, A., Sorbel, J., Rousseau, F. & Corey, L. (2005).** Safety and antiviral activity of emtricitabine (FTC) for the treatment of chronic hepatitis B infection: a two-year study. *Journal of Hepatology* **43**, 60-66.

- Gloire, G., Charlier, E. & Piette, J. (2008).** Regulation of CD95/APO-1/Fas-induced apoptosis by protein phosphatases. *Biochemical Pharmacology* doi:10.1016/j.bcp.2008.06.023.
- Gonzalez, S. A. (2010).** Management of recurrent hepatitis C following liver transplantation. *Gastroenterology & Hepatology (N Y)* **6**, 637-645.
- Gray, N. M., Marr, C. L. P., Penn, C. R., Cameron, J. M. & Bethell, R. C. (1995).** The Intracellular Phosphorylation Of (-)-2'-Deoxy-3'-Thiacytidine (3TC) And The Incorporation Of 3TC 5'-Monophosphate Into DNA By HIV-I Reverse Transcriptase And Human DNA Polymerase γ . *Biochemical Pharmacology* **50**, 1043-1051.
- Graziewicz, M. A., Day, B. J. & Copeland, W. C. (2002).** The mitochondrial DNA polymerase as a target of oxidative damage. *Nucleic Acids Research* **30**, 2817-2824.
- Green, D. R. & Kroemer, G. (2004).** The Pathophysiology of Mitochondrial Cell Death. *Science* **305**, 626-629.
- Green, D. R. & Reed, J. C. (2008).** Mitochondria And Apoptosis. *Science* **281**, 1309-1312.
- Gretch, D. R. (1997).** Diagnostic Tests for Hepatitis C. *Hepatology* **26**, 43S-47S.
- Hara, Y., Hino, K., Okuda, M., Furutani, T., Hidaka, I., Yamaguchi, Y., Korenaga, M., Li, K., Weinman, S. A., Lemon, S. M. & Okita, K. (2006).** Hepatitis C virus core protein inhibits deoxycholic acid-mediated apoptosis despite generating mitochondrial reactive oxygen species. *Journal of Gastroenterology* **41**, 257-268.
- Hodge, G., Hodge, S. & Han, P. (2000).** Increased levels of apoptosis of leukocyte subsets in cultured PBMCs compared to whole blood as shown by Annexin V binding: Relevance to cytokine production. *CYTOKINE* **12**, 1763-1768.
- Hodge, G. L., Flower, R. & Han, P. (1999).** Optimal storage conditions for preserving granulocyte viability as monitored by Annexin V binding in whole blood. *Journal of Immunological Methods*, 27-38.
- Honkoop, P., De Man, R. A., Scholte, H. R., Zondervan, P. E., Van Der Berg, J. W. O., Rademakers, L. H. P. M. & Schalm, S. W. (1997).** Effect of Lamivudine on Morphology and Function of Mitochondria in Patients With Chronic Hepatitis B. *Hepatology* **26**, 211-215.
- Huang, J. F., Yu, M. L., Huang, C. F., Chiu, C. F., Dai, C. Y., Huang, C. I., Yeh, M. L., Yang, J. F., Hsieh, M. Y., Hou, N. J., Lin, Z. Y., Chen, S. C., Wang, L. Y. & Chuang, W. L. (2011).** The efficacy and safety of pegylated interferon plus ribavirin combination therapy in chronic hepatitis c patients with hepatocellular carcinoma post curative therapies - a multicenter prospective trial. *Journal of Hepatology* **54**, 219-226.
- Iacobellis, A., Ippolito, A. & Andriulli, A. (2008).** Antiviral therapy in hepatitis C virus cirrhotic patients in compensated and decompensated condition. *World Journal of Gastroenterology* **14**, 6467-6472.
- Jenssen, H. L., Redmann, K. & Mix, E. (1986).** Flow cytometric estimation of transmembrane potential of macrophages--a comparison with microelectrode measurements. *Cytometry* **7**, 339-346.
- Kao, J. H. (2007).** Appropriate use of interferon for treatment of chronic hepatitis B. *Hepatology Research* **37**, 47-54.
- Kao, J. H. & Chen, D. S. (2005).** Changing disease burden of hepatocellular carcinoma in the Far East and Southeast Asia. *Liver International* **4**, 696-703.
- Kaser, A., Nagata, S. & Tilg, H. (1999).** Interferon Alpha Augments Activation-Induced T Cell Death by Upregulation of Fas (CD95/APO-1) and Fas Ligand Expression. *CYTOKINE* **11**, 736-743.

- Katzenstein, T. L., Dickmeiss, E., Aladdin, H., Hede, A., Nielsen, C., Nielsen, H., Jørgensen, L. B. & Gerstoft, J. (2000).** Failure to develop HIV infection after receipt of HIV-contaminated blood and postexposure prophylaxis. *Annals of Internal Medicine* **133**, 31-34.
- Kawamura, Y., Ikeda, K., Arase, Y., Yatsuji, H., Sezaki, H., Hosaka, T., Akuta, N., Kobayashi, M., Suzuki, F., Suzuki, Y. & Kumada, H. (2007).** Viral Elimination Reduces Incidence of Malignant Lymphoma in Patients with Hepatitis C. *The American Journal of Medicine* **120**, 1034-1041.
- Keeffe, E. B. (2007).** Hepatitis B: Explosion of New Knowledge. *Gastroenterology* **133**, 1718–1728.
- Koopman, G., Reutelingsperger, C. P., Kuijten, G. A., Keehnen, R. M., Pals, S. T. & van Oers, M. H. (1994).** Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* **84**, 1415-1420.
- Korenaga, M., Okuda, M., Otani, K., Wang, T., Li, Y. & Weinman, S. A. (2005).** Mitochondrial Dysfunction in Hepatitis C. *Journal of Clinical Gastroenterology* **39**, S162-S166.
- Laguno, M., Cifuentes, C., Murillas, J., Veloso, S., Larrousse, M., Payeras, A., Bonet, L., Vidal, F., Milinkovic, A., Bassa, A., Villalonga, C., Pérez, I., Tural, C., Martínez-Rebollar, M., Calvo, M., Blanco, J. L., Martínez, E., Sánchez-Tapias, J. M., Gatell, J. M. & Mallolas, J. (2009).** Randomized Trial Comparing Pegylated Interferon Alpha-2b Versus Pegylated Interferon Alpha-2a, Both Plus Ribavirin, to Treat Chronic Hepatitis C in Human Immunodeficiency Virus Patients. *Hepatology* **49**, 22-31.
- Laguno, M., Milinkovic, A., de Lazzari, E., Murillas, J., Martinez, E., Blanco, J. L., Loncá, M., Biglia, A., Leon, A., Garcia, M., Larrousse, M., Garcia, F., Miró, J. M., Gatell, J. M. & Mallolas, J. (2005).** Incidence and risk factors for mitochondrial toxicity in treated HIV/HCV-coinfected patients. *Antiviral Therapy* **10**, 423-429.
- Lai, C. L. & Yuen, M. F. (2007).** Natural History and Treatment of Chronic Hepatitis B: A Critical Evaluation of Standard Treatment Criteria and End Points. *Annals of Internal Medicine* **147**, 58-61.
- Lapinski, T. W., Kowalczyk, O., Prokopowicz, D. & Chyczewski, L. (2004).** Serum concentration of sFas and sFasL in healthy HBsAg carriers, chronic viral hepatitis B and C patients. *World Journal of Gastroenterology* **10**, 3650-3653.
- Lee, D. A. & Molinaro, G. A. (2003).** Activated peripheral T lymphocytes undergo apoptosis when cultured with monocytes activated by HLA class II ligation. *Cellular Immunology* **225**, 101-112.
- Lee, Y. I., Hwang, J. M., Im, J. H., Lee, Y. I., Kim, N. S., Kim, D. G., Yu, D. Y., Moon, H. B. & Park, S. K. (2004).** Human Hepatitis B Virus-X Protein Alters Mitochondrial Function and Physiology in Human Liver Cells. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 15460-15471.
- Lewis, W., Day, B. J. & Copeland, W. C. (2003).** Mitochondrial Toxicity of NRTI Antiviral Drugs: an Integrated Cellular Perspective. *Nature Reviews* **2**, 812-822.
- Liaw, Y. F., Sheen, I. S., Lee, C. M., Akarca, U. S., Papatheodoridis, G. V., Suet-Hing Wong, F., Chang, T. T., Horban, A., Wang, C., Kwan, P., Buti, M., Prieto, M., Berg, T., Kitrinis, K., Peschell, K., Mondou, E., Frederick, D., Rousseau, F. & Schiff, E. R. (2011).** Tenofovir disoproxil fumarate (TDF), emtricitabine/TDF, and entecavir in patients with decompensated chronic hepatitis B liver disease. *Hepatology* **53**, 62-72.

- Lichtenstein, K. A. (2005).** Redefining Lipodystrophy Syndrome - Risks and Impact on Clinical Decision Making. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome* **39**, 395-400.
- Lie-Injo, L. E., Balasegaram, M., Lopez, C. G. & Herrera, A. R. (1983).** Hepatitis B virus DNA in liver and white blood cells of patients with hepatoma (nur Abstract). *DNA* **2**, 301-308.
- Lieberman, H. M., Tung, W. W. & Shafritz, D. A. (1987).** Splenic replication of hepatitis B virus in the chimpanzee chronic carrier (nur Abstract). *Journal of Medical Virology* **21**, 347-359.
- Liebman, H. A. & Stasi, R. (2007).** Secondary immune thrombocytopenic purpura. *Current Opinion in Hematology* **14**, 557-573.
- Little, J. R., Brecher, G., Bradley, T. R. & Rose, S. (1962).** Determination of Lymphocyte Turnover by Continuous Infusion of H3 Thymidine *Blood* **19**, 236-242.
- Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R. & Wang, X. (1996).** Induction of Apoptotic Program in Cell-Free Extracts: Requirement for dATP and Cytochrome c. *Cell* **86**, 147-157.
- Locarnini, S., McMillan, J. & Bartholomeusz, A. (2003).** The Hepatitis B Virus and Common Mutants. *Seminars in Liver Disease* **23**, 5-20.
- Lok, A. S. F. & Gunaratnam, N. T. (1997).** Diagnosis of Hepatitis C. *Hepatology* **26**, 48S-56S.
- Lok, A. S. F. & McMahon, B. J. (2007).** Chronic Hepatitis B. *Hepatology* **45**, 507-539.
- Looke, D. F. M. & Grove, D. I. (May 26, 1990).** Failed prophylactic zidovudine after needlestick injury. *The Lancet*, 1280.
- López, S., Negrodo, E., Garrabou, G., Puig, J., Ruiz, L., Sanjurjo, E., Ramos, X., Infante, A. B., Casademont, J., Cardellach, F., Clotet, B. & Miró, O. (2006).** Longitudinal Study on Mitochondrial Effects of Didanosine-Tenofovir Combination. *AIDS Research and Human Retroviruses* **22**, 33-39.
- Lorenzoni, P. J., Scola, R. H., Kay, C. S., Arndt, R. C., Silvado, C. E. & Werneck, L. C. (2011).** MERRF: Clinical features, muscle biopsy and molecular genetics in Brazilian patients. *Mitochondrion* 2011 Feb 15 [Epub ahead of print].
- Lu, Y. P., Guo, T., Wang, B. J., Dong, J. H., Zhu, J. F., Liu, Z., Lu, M. J. & Yang, D. L. (2008).** Replication of clinical hepatitis B virus isolate and its application for selecting antiviral agents for chronic hepatitis B patients. *World Journal of Gastroenterology* **14**, 3490-3496.
- Lugli, E., Troiano, L., Ferraresi, R., Roat, E., Prada, N., Nasi, M., Pinti, M., Cooper, E. L. & Cossarizza, A. (2005).** Characterization of Cells with Different Mitochondrial Membrane Potential During Apoptosis. *Cytometry Part A*, 28-35.
- Macallan, D. C. (2001).** Metabolic Syndromes in Human Immunodeficiency Virus Infection. *Hormone Research* **55**, 36-41.
- Machida, K., Cheng, K. T. H., Lai, C. K., Jeng, K. S., Sung, V. M. H. & Lai, M. M. C. (2006).** Hepatitis C Virus Triggers Mitochondrial Permeability Transition with Production of Reactive Oxygen Species, Leading to DNA Damage and STAT3 Activation. *Journal of Virology* **80**, 7199-7207.
- Maheshwari, A., Ray, S. & Thuluvath, P. J. (2008).** Acute hepatitis C. *The Lancet* **372**, 321-332.
- Major, M. E. & Feinstone, S. M. (1997).** The Molecular Virology of Hepatitis C. *Hepatology* **25**, 1527-1538.
- Mallon, P. W. G., Unemori, P., Sedwell, R., Morey, A., Rafferty, M., Williams, K., Chisholm, D., Samaras, K., Emery, S., Kelleher, A., Cooper, D. A. & Carr, A. (2005).** In Vivo, Nucleoside Reverse-Transcriptase Inhibitors Alter Expression of

- Both Mitochondrial and Lipid Metabolism Genes in the Absence of Depletion of Mitochondrial DNA. *Journal of Infectious Diseases* **191**, 1686-1696.
- Marcellin, P., Lévy, S. & Erlinger, S. (1997).** Therapy of Hepatitis C: Patients With Normal Aminotransferase Levels. *Hepatology* **26**, 133S-136S.
- Martin, P. & Jensen, D. M. (2008).** Ribavirin in the treatment of chronic hepatitis C. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **23**, 844-855.
- Martinez, S. M., Crespo, G., Navasa, M. & Forns, X. (2011).** Noninvasive assessment of liver fibrosis. *Hepatology* **53**, 325-335.
- Martinot-Peignoux, M., Boyer, N., Le Breton, V., Guludec, G., Castelnau, C., Akremi, R. & Marcellin, P. (2000).** A New Step Toward Standardization of Serum Hepatitis C Virus–RNA Quantification in Patients With Chronic Hepatitis C. *Hepatology* **31**, 726-729.
- Mason, A. L., Lau, J. Y. N., Hoang, N., Qian, K., Alexander, G. J. M., Xu, L., Guo, L., Jacob, S., Regenstein, F. G., Zimmerman, R., Everhart, J. E., Wasserfall, C., MacLaren, N. K. & Perrillo, R. P. (1999).** Association of Diabetes Mellitus and Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Hepatology* **29**, 328-333.
- Mast, E. E., Margolis, H. S., Fiore, A. E., Brink, E. W., Goldstein, S. T., Wang, S. A., Moyer, L. A., Bell, B. P. & Alter, M. J. (2005).** A Comprehensive Immunization Strategy to Eliminate Transmission of Hepatitis B Virus Infection in the United States *MMWR Recommendations and Reports* **54**, 1-23.
- Mathumani, K., Hwang, D. S., Desai, B. M., Zhang, D., Dayes, N., Green, D. R. & Weiner, D. B. (2002).** HIV-1 Vpr Induces Apoptosis through Caspase 9 in T Cells and Peripheral Blood Mononuclear Cells. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 37820-37831.
- Mathur, A., Hong, Y., Kemp, B. K., Alvarez Barrientos, A. & Erusalimskya, J. D. (2000).** Evaluation of fluorescent dyes for the detection of mitochondrial membrane potential changes in cultured cardiomyocytes. *Cardiovascular Research* **46**, 126-138.
- Mathurin, P., Moussalli, J., Cadranel, J. F. O., Thibault, V., Charlotte, F., Dumouchel, P., Cazier, A., Huraux, J. M., Devergie, B., Vidaud, M., Opolon, P. & Poynard, T. (1998).** Slow Progression Rate of Fibrosis in Hepatitis C Virus Patients With Persistently Normal Alanine Transaminase Activity. *Hepatology* **27**, 868-872.
- Matsuda, T., Bebenek, K., Masutani, C., Rogozin, I. B., Hanaoka, F. & Kunkel, T. A. (2001).** Error Rate and Specificity of Human and Murine DNA Polymerase Eta. *Journal of Molecular Biology* **312**, 335-346.
- Mayer, A., Höckel, M., Wree, A., Leo, C., Horn, L.-C. & Vaupel, P. (2008).** Lack of Hypoxic Response in Uterine Leiomyomas despite Severe Tissue Hypoxia. *Cancer Research* **68**, 4719-4726.
- Mazucco, C. E., Hamatake, R. K., Colonna, R. J. & Tenney, D. J. (2008).** Entecavir for Treatment of Hepatitis B Virus Displays No In Vitro Mitochondrial Toxicity or DNA Polymerase Gamma Inhibition. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* **52**, 598-605.
- McComsey, G. A., Paulsen, D. M., Lonergan, J. T., Hessenthaler, S. M., Hoppel, C. L., Williams, V. C., Fisher, R. L., Cherry, C. L., White-Owen, C., Thompson, K. A., Ross, S. T., Hernandez, J. E. & Ross, L. L. (2005).** Improvements in lipoatrophy, mitochondrial DNA levels and fat apoptosis after replacing stavudine with abacavir or zidovudine. *AIDS* **19**, 15-23.
- McWilliams, R. G. & Blanshard, K. S. (1994).** The risk of blood splash contamination during angiography. *Clin Radiol* **49**, 59-60.

- Mehta, S. H., Brancati, F. L., Strathdee, S. A., Pankow, J. S., Netski, D., Coresh, J., Szklo, M. & Thomas, D. L. (2003).** Hepatitis C Virus Infection and Incident Type 2 Diabetes. *Hepatology* **38**, 50-56.
- Meier, V., Mihm, S., Braun Wietzke, P. & Ramadori, G. (2001).** HCV-RNA positivity in peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic HCV infection: does it really mean viral replication? *World Journal of Gastroenterology* **7**, 228-234.
- Miró, Ò., López, S., Pedrol, E., Rodríguez-Santiago, B., Martínez, E., Soler, A., Milinkovic, A., Casademont, J., Nunes, V., Gatell, J. M. & Cardellach, F. (2003).** Mitochondrial DNA depletion and respiratory chain enzyme deficiencies are present in peripheral blood mononuclear cells of HIV-infected patients with HAART-related lipodystrophy. *Antiviral Therapy* **8**, 333-338.
- Miró, Ò., Villarroya, J., Garrabou, G., López, S., de la Concepción, M. R., Pedrol, E., Martínez, E., Giralt, M., Gatell, J. M., Cardellach, F., Casademont, J. & Villarroya, F. (2005).** In vivo effects of highly active antiretroviral therapies containing the protease inhibitor nelfinavir on mitochondrially driven apoptosis. *Antiviral Therapy* **10**, 945-951.
- Modica-Napolitano, J. S., Weiss, M. J., Chen, L. B. & Aprille, J. R. (1984).** Rhodamine 123 inhibits bioenergetic function in isolated rat liver mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **118**, 717-723.
- Molyneux, S. L., Young, J. M., Florkowski, C. M., Lever, M. & George, P. M. (2008).** Coenzyme Q10: Is There a Clinical Role and a Case for Measurement? *Clinical Biochemist Reviews* **29**, 71-82.
- Moore, R. D. (2011).** Epidemiology of HIV infection in the united states: implications for linkage to care. *Clin Infect Dis* **52 Suppl 2**, S208-213.
- Muller, F. L., Liu, Y., Abdul-Ghani, M. A., Lustgarten, M. S., Bhattacharya, A., Jang, Y. C. & Van Remmen, H. (2008).** High rates of superoxide production in skeletal-muscle mitochondria respiring on both complex I- and complex II-linked substrates. *The Biochemical Journal* **409**, 491-499.
- Mummadi, R. R., Petersen, J. R., Xiao, S. Y. & Snyder, N. (2010).** Role of simple biomarkers in predicting fibrosis progression in HCV infection. *World J Gastroenterol* **16**, 5710-5715.
- Nakamoto, Y., Kaneko, S. & Kobayashi, K. (2002).** Increased susceptibility to apoptosis and attenuated Bcl-2 expression in T lymphocytes and monocytes from patients with advanced chronic hepatitis C. *Journal of Leukocyte Biology* **72**, 49-55.
- Negredo, E., Miró, Ò., Rodríguez-Santiago, B., Garrabou, G., Estany, C., Masabeu, À., Force, L., Barrufet, P., Cucurull, J., Domingo, P., Alonso-Villaverde, C., Bonjoch, A., Morén, C., Pérez-Álvarez, N. & Clotet, B. (2009).** Improvement of Mitochondrial Toxicity in Patients Receiving a Nucleoside Reverse-Transcriptase Inhibitor–Sparing Strategy: Results from the Multicenter Study with Nevirapine and Kaletra (MULTINEKA). *Clinical Infectious Diseases* **49**, 892–900.
- Ohnishi, K., Iida, S., Iwama, S., Goto, N., Nomura, F., Takashi, M., Mishima, A., Kono, K., Kimura, K., Musha, H., Kotota, K. & Okuda, K. (1982).** The Effect of Chronic Habitual Alcohol Intake on the Development of Liver Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma. *Cancer* **49**, 672-677.
- Okuda, M., Li, K., Beard, M. R., Showalter, L. A., Scholle, F., Lemon, S. M. & Weinman, S. A. (2002).** Mitochondrial Injury, Oxidative Stress, and Antioxidant Gene Expression Are Induced by Hepatitis C Virus Core Protein. *Gastroenterology* **122**, 366-375.
- Papatheodoridis, G. V. (2011).** Treatment of HBeAg-negative chronic hepatitis B patients with nucleos(t)ide analogues. *Liver International* **31**, 95-103.

- Pham, T. N., MacParland, S. A., Mulrooney, P. M., Cooksley, H., Naoumov, N. V. & Michalak, T. I. (2004). Hepatitis C virus persistence after spontaneous or treatment-induced resolution of hepatitis C. *J Virol* **78**, 5867-5874.
- Piccoli, C., Scrima, R., D'Aprile, A., Ripoli, M., Lecce, L., Boffoli, D. & Capitanio, N. (2006). Mitochondrial dysfunction in hepatitis C virus infection. *Biochimica et Biophysica Acta* **1757**, 1429-1437.
- Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A. J., Houghton, M., Rosa, D., Grandi, G. & Abrignani, S. (1998). Binding of Hepatitis C Virus to CD81. *Science* **282**, 938.
- Pontisso, P., Poon, M. C., Tiollais, P. & Brechot, C. (1984). Detection of hepatitis B virus DNA in mononuclear blood cells. *British Medical Journal* **288**, 1563-1566.
- Poot, M. & Pierce, R. H. (1999). Detection of changes in mitochondrial function during apoptosis by simultaneous staining with multiple fluorescent dyes and correlated multiparameter flow cytometry. *Cytometry* **35**, 311-317.
- Pouget, J.-P. & Mather, S. J. (2001). General aspects of the cellular response to low- and high-LET radiation. *European Journal of Nuclear Medicine* **28**, 541-561.
- Prieto, M., Olaso, V., Verdú, C., Córdoba, J., Gisbert, C., Rayón, M., Carrasco, D., Berenguer, M., Higón, M. D. & Berenguer, J. (1995). Does the Healthy Hepatitis C Virus Carrier State Really Exist? An Analysis Using Polymerase Chain Reaction. *Hepatology* **22**, 413-417.
- Pruszek, J., Ludwig, W., Blak, A., Alavian, K. & Isacson, O. (2009). CD15, CD24, and CD29 define a surface biomarker code for neural lineage differentiation of stem cells. *Stem Cells* **27**, 2928-2940.
- Rabing Christensen, E., Stegger, M., Jensen-Fangel, S., Laursen, A. L. & Ostergaard, L. (2004). Mitochondrial DNA Levels in Fat and Blood Cells from Patients with Lipodystrophy or Peripheral Neuropathy and the Effect of 90 Days of High-Dose Coenzyme Q Treatment: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Pilot Study. *Clinical Infectious Diseases* **39**, 1371-1379.
- Rahmani, Z., Huh, K.-W., Lasher, R. & Siddiqui, A. (2000). Hepatitis B Virus X Protein Colocalizes to Mitochondria with a Human Voltage-Dependent Anion Channel, HVDAC3, and Alters Its Transmembrane Potential. *Journal of Virology* **74**, 2840-2846.
- RKI (2010a). Impfkalender. *Epidemiologisches Bulletin* **30/2010**.
- RKI (2010b). Virushepatitis B, C und D im Jahr 2009. *Epidemiologisches Bulletin* **20/2010**.
- RKI Stand 1998
http://www.rki.de/clin_116/nn_468106/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Mbl_HepatitisChtml#doc203188bodyText2.
- Roisman, F. R., Castello, A., Fainbiom, H., Morelli, A. & Fainbiom, L. (1994). Hepatitis B Virus Antigens in Peripheral Blood Mononuclear Cells during the Course of Viral Infection. *Clinical Immunology And Immunopathology* **70**, 99-103.
- Romet-Lemonne, J. L., Elfassi, E., Haseltine, W. & Essex, M. (1983a). Infection of Bone Marrow Cells by Hepatitis B Virus. *The Lancet* **2**, 732.
- Romet-Lemonne, J. L., McLane, M. F., Elfassi, E., Haseltine, W. A., Azocar, J. & Essex, M. (1983b). Hepatitis B virus infection in cultured human lymphoblastoid cells. *Science* **221**, 667-669.
- Rottenberg, H. & Wu, S. (1998). Quantitative assay by flow cytometry of the mitochondrial membrane potential in intact cells. *Biochimica et Biophysica Acta* **1404**, 393-404.
- Salvioli, S., Ardizzoni, A., Franceschi, C. & Cossarizza, A. (1997). JC-1, but not DiOC₆(3) of rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess delta psi

- changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. *FEBS Letters* **411**, 77-82.
- Sansonno, D., Iacobelli, A. R., Cornacchiulo, V., Iodice, G. & Dammacco, F. (1996).** Detection of hepatitis C virus (HCV) proteins by immunofluorescence and HCV RNA genomic sequences by non-isotopic in situ hybridization in bone marrow and peripheral blood mononuclear cells of chronically HCV-infected patients. *Clinical and Experimental Immunology* **103**, 414-421.
- Sanyal, A., Poklepovic, A., Moyneur, E. & Barghout, V. (2010).** Population-based risk factors and resource utilization for HCC: US perspective. *Current Medical Research and Opinion* **26**, 2183-2191.
- Saumoy, M., Vidal, F., Peraire, J., Sauleda, S., Veal, A. M., Viladés, C., Ribera, E. & Richart, C. (2004).** Proximal tubular kidney damage and tenofovir: a role for mitochondrial toxicity? *AIDS* **18**, 1741-1749.
- Sayiner, A. A., Agca, H., Sengonul, A., Celik, A. & Akarsu, M. (2007).** A new hepatitis B virus vaccine escape mutation in a renal transplant recipient. *Journal of Clinical Virology* **38**, 157-160.
- Scheuer, P. J., Ashrafzadeh, P., Sherlock, S., Brown, D. & Dusheiko, G. M. (1992).** The Pathology of Hepatitis C. *Hepatology* **15**, 567-571.
- Schilling, B. E., Nelson, D. R., Proctor, J. E., Diamond, S. S., Kaul, S. & Hawkins, C. (1995).** The Nonclinical Toxicologic Profile of Stavudine. *Current Therapeutic Research* **56**, 201-218.
- Schwartz, L. M. & Ashwell, J. D. (2001).** *Apoptosis*: Academic Press.
- Seeger, C. & Mason, W. S. (2000).** Hepatitis B Virus Biology. *Microbiology And Molecular Biology Reviews* **64**, 51-68.
- Setijoso, E., Robberecht, W. R., Van Eycken, P., Roskams, T., Tack, J. & Van Steenberghe, W. (1999).** Myasthenia Gravis - Another Autoimmune Disease Associated with Hepatitis C Virus Infection. *Digestive Diseases and Sciences* **44**, 186-189.
- Shafraun, S. D., Mashinter, L. D. & Roberts, S. E. (2005).** The effect of low-dose ritonavir monotherapy on fasting serum lipid concentrations. *HIV Medicine* **6**, 421-425.
- Sharma, S. & Lichtenstein, A. (2008).** Dexamethasone-induced apoptotic mechanisms in myeloma cells investigated by analysis of mutant glucocorticoid receptors. *Blood* **112**, 1338-1345.
- Shindo, M., Arai, K., Sokawa, Y. & Okuno, T. (1995).** The Virological and Histological States of Anti-Hepatitis C Virus-Positive Subjects With Normal Liver Biochemical Values. *Hepatology* **22**, 418-425.
- Shirakata, Y. & Koike, K. (2003).** Hepatitis B Virus X Protein Induces Cell Death by Causing Loss of Mitochondrial Membrane Potential. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 22071-22078.
- Silvestri, F., Pipan, C., Barillari, G., Zaja, F., Fanin, R., Infanti, L., Russo, D., Falasca, E., Botta, G. A. & Baccarani, M. (1996).** Prevalence of hepatitis c virus infection in patients with lymphoproliferative disorders. *Blood* **87**, 4296-4301.
- Simmonds, P., Bukh, J., Combet, C., Deléage, G., Enomoto, N., Feinstone, S., Halfon, P., Inchauspé, G., Kuiken, C., Maertens, G., Mizokami, M., Murphy, D. G., Okamoto, H., Pawlotsky, J. M., Penin, F., Sablon, E., Shin-I, T., Stuyver, L. J., Thiel, H. J., Viazov, S., Weiner, A. J. & Widell, A. (2005).** Consensus Proposals for a Unified System of Nomenclature of Hepatitis C Virus Genotypes. *Hepatology* **42**, 962-973.
- Smiley, S. T., Reers, M., Mottola-Hartshorn, C., Lin, M., Chen, A., Smith, T. W., Steele Jr, G. D. & Chen, L. B. (1991).** Intracellular heterogeneity in

- mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 3671-3675.
- Sterky, F. H. & Larsson, N.-G. (2008)**. Complex I: A Complex Gateway to the Powerhouse. *Cell Metabolism* **7**, 278-279.
- Sternfeld, T., Schmid, M., Tischleder, A., Mudra, S., Schlamp, A., Kost, B. P., Gruber, R., Youle, M., Bogner, J. R. & Goebel, F. D. (2007)**. The influence of HIV infection and antiretroviral therapy on the mitochondrial membrane potential of peripheral mononuclear cells. *Antiviral Therapy* **12**, 769-778.
- Sternfeld, T., Tischleder, A., Schuster, M. & Bogner, J. R. (2009)**. Mitochondrial membrane potential and apoptosis of blood mononuclear cells in untreated HIV-1-infected patients. *HIV Medicine* **10**, 512-519.
- Stoll-Becker, S., Repp, R., Glebe, D., Schaefer, S., Kreuder, J., Kann, M., Lampert, F. & Gerlich, W. H. (1997)**. Transcription of Hepatitis B Virus in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Persistently Infected Patients. *Journal of Virology* **71**, 5399-5407.
- Strader, D. B., Wright, T., Thomas, D. L. & Seeff, L. B. (2004)**. Diagnosis, Management, and Treatment of Hepatitis C. *Hepatology* **39**, 1147-1171.
- Sugai, Y. & Okamoto, H. (1989)**. State of Hepatitis B Virus DNA in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Persistently Infected Individuals : Correlation with e Antigen and Viral DNA in the Serum as Well as with the Activity of Liver Disease. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* **158**, 73-84.
- Sung, J. J. Y., Tsoi, K. K. F., Wong, V. W. S., Li, K. C. T. & Chan, H. L. Y. (2008)**. Meta-analysis: Treatment of hepatitis B infection reduces risk of hepato-cellular carcinoma. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* **28**, 1067-1077.
- Szmit, E., Trzonkowski, P., Mysliwska, J., Foerster, J. & Mysliwski, A. (2002)**. Ex vivo apoptotic potential of peripheral blood mononuclear cells of the elderly human subject. *Cell Biology International* **26**, 517-527.
- Takada, S., Shirakata, Y., Kaneniwa, N. & Koike, K. (1999)**. Association of hepatitis B virus X protein with mitochondria causes mitochondrial aggregation at the nuclear periphery, leading to cell death. *Oncogene* **18**, 6965-6973.
- Tan, M.-L., Balabin, I. & Onuchic, J. N. (2004)**. Dynamics of Electron Transfer Pathways in Cytochrome c Oxidase. *Biophysical Journal* **86**, 1813-1819.
- Taya, N., Torimoto, Y., Shindo, M., Hirai, K., Hasebe, C. & Kohgo, Y. (2000)**. Fas-mediated apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in patients with hepatitis C. *British Journal of Haematology* **110**, 89-97.
- Telcian, A. G., Laza-Stanca, V., Edwards, M. R., Harker, J. A., Wang, H., Bartlett, N. W., Mallia, P., Zdrenghea, M. T., Kebabze, T., Coyle, A. J., Openshaw, P. J., Stanciu, L. A. & Johnston, S. L. (2011)**. RSV-induced bronchial epithelial cell PD-L1 expression inhibits CD8+ T cell nonspecific antiviral activity. *J Infect Dis* **203**, 85-94.
- Teles, A. V. F., Ureshino, R. P., Dorta, D. J., Lopes, G. S., Hsu, Y.-T. & Smaili, S. S. (2008)**. Bcl-x(L) inhibits Bax-induced alterations in mitochondrial respiration and calcium release. *Neuroscience Letters* **442**, 96-99.
- Teutsch, S., Luciani, F., Scheuer, N., McCredie, L., Hosseiny, P., Rawlinson, W., Kaldor, J., Dore, G. J., Dolan, K., Ffrench, R., Lloyd, A., Haber, P. & Levy, M. (2010)**. Incidence of primary hepatitis C infection and risk factors for transmission in an Australian prisoner cohort. *BMC Public Health* **10**, 633.
- Thomas, H. C. (2007)**. Best practice in the treatment of chronic hepatitis B: A summary of the European Viral Hepatitis Educational Initiative (EVHEI). *Journal of Hepatology* **47**, 588-597.

- Thomssen, R., Bonk, S., Propfe, C., Heermann, K.-H., Köchel, H. & Uy, A. (1992).** Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein. *Medical Microbiology and Immunology* **181**, 293-300.
- Thomssen, R., Bonk, S. & Thiele, A. (1993).** Density heterogeneities of hepatitis C virus in human sera due to the binding of beta-lipoproteins and immunoglobulins. *Medical Microbiology and Immunology* **182**, 329-334.
- Tokars, J. I., Marcus, R., Culver, D. H., Schable, C. A., McKibben, P. S., Bandea, C. I. & Bell, D. M. (1993).** Surveillance of HIV infection and zidovudine use among health care workers after occupational exposure to HIV-infected blood. The CDC Cooperative Needlestick Surveillance Group. *Annals of Internal Medicine* **118**, 913-919.
- Tosini, W., Muller, P., Prazuck, T., Benabdelmoumen, G., Peyrouse, E., Christian, B., Quertainmont, Y., Bouvet, E. & Rabaud, C. (2010).** Tolerability of HIV postexposure prophylaxis with tenofovir/emtricitabine and lopinavir/ritonavir tablet formulation. *AIDS* **24**, 2375-2380.
- Tsai, C.-C., Follis, K. E., Yarnall, M. & Blakley, G. A. (1989).** Toxicity and Efficacy of 2',3'-Dideoxycytidine in Clinical Trials of Pigtailed Macaques Infected with Simian Retrovirus Type 2. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **33**, 1908-1914.
- Tuan, T. C., Hsu, T. G., Fong, M. C., Hsu, C. F., Tsai, K. K. C., Lee, C. Y. & Kong, C. W. (2008).** Deleterious effects of short-term, high-intensity exercise on immune function: evidence from leucocyte mitochondrial alterations and apoptosis. *British Journal of Sports Medicine* **42**, 11-15.
- Tzagoloff, A. (1982).** *Mitochondria*. New York and London: Plenum Press.
- Valente, F., Lago, B. V., Castro, C. A., Almeida, A. J., Gomes, S. A. & Soares, C. C. (2010).** Epidemiology and molecular characterization of hepatitis B virus in Luanda, Angola. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **105**, 970-977.
- Varela, A. T., Gomes, A. P., Simoes, A. M., Teodoro, J. S., Duarte, F. V., Rolo, A. P. & Palmeira, C. M. (2008).** Indirubin-3'-oxime impairs mitochondrial oxidative phosphorylation and prevents mitochondrial permeability transition induction. *Toxicology and Applied Pharmacology* **233**, 179-185.
- Venhoff, N., Setzer, B., Melkaoui, K. & Walker, U. A. (2007).** Mitochondrial toxicity of tenofovir, emtricitabine and abacavir alone and in combination with additional nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Antiviral Therapy* **12**, 1075-1085.
- Verhoeven, A. J., Verhaar, R., Gouwerok, E. G. W. & Korte, D. d. (January 2005).** The mitochondrial membrane potential in human platelets: a sensitive parameter for platelet quality. *Transfusion* **45**, 82-89.
- Vezali, E., Aghemo, A. & Colombo, M. (2010).** A review of the treatment of chronic hepatitis C virus infection in cirrhosis. *Clinical Therapeutics* **32**, 2117-2138.
- Vidal, F., Domingo, J. C., Guallar, J., Saumoy, M., Cordobilla, B., Rosa, R. S. d. I., Giralt, M., Álvarez, M. L., López-Dupla, M., Torres, F., Villarroya, F., Cihlar, T. & Domingo, P. (November 2006).** In Vitro Cytotoxicity and Mitochondrial Toxicity of Tenofovir Alone and in Combination with Other Antiretrovirals in Human Renal Proximal Tubule Cells. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* **50**, 3824-3832.
- Walker, U. A., Setzer, B. & Venhoff, N. (2002).** Increased long-term mitochondrial toxicity in combinations of nucleoside analogue reverse-transcriptase inhibitors. *AIDS* **16**, 2165-2173.
- Wallace, D. C. (1999).** Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* **283**, 1482-1488.

- Wang, T. & Weinman, S. A. (2006).** Causes and consequences of mitochondrial reactive oxygen species generation in hepatitis C. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **21**, S34-S37.
- Wang, Y. & Jia, J. (2011).** Control of hepatitis B in China: prevention and treatment. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* **9**, 21-25.
- Wasmuth, J. C., Hackbarth, F., Rockstroh, J. K., Sauerbruch, T. & Spengler, U. (2003).** Changes of lymphocyte apoptosis associated with sequential introduction of highly active antiretroviral therapy. *HIV Medicine* **4**, 111-119.
- Weclawiak, H., Kamar, N., Ould-Mohamed, A., Cardeau-Desangles, I., Izopet, J. & Rostaing, L. (2010).** Treatment of chronic hepatitis C virus infection in dialysis patients: an update. *Hepatitis Research and Treatment* **2010**, 267412.
- Wilkins, R. C., Kutzner, B. C., Truong, M., Sanchez-Dardon, J. & McLean, J. R. N. (2002).** Analysis of Radiation-Induced Apoptosis in Human Lymphocytes: Flow Cytometry Using Annexin V and Propidium Iodide Versus Neutral Comet Assay. *Cytometry* **48**, 14-19.
- Williams, I. T., Bell, B. P., Kuhnert, W. & Alter, M. J. (2011).** Incidence and transmission patterns of acute hepatitis C in the United States, 1982-2006. *Archives of Internal Medicine* **171**, 242-248.
- Wolfinger, R. & Chang, M.** Comparing the SAS GLM and MIXED Procedures for Repeated Measures. *SAS Institute Inc, Cary, NC*.
- Wu, Y., Xing, D., Liu, L. & Gao, B. (2008).** Regulation of Bax activation and apoptotic response to UV irradiation by p53 transcription-dependent and -independent pathways. *Cancer Letters* **271**, 231-239.
- Yamada, E., Montoya, M., Schuettler, C. G., Hickling, T. P., Tarr, A. W., Vitelli, A., Dubuisson, J., Patel, A. H., Ball, J. K. & Borrow, P. (2005).** Analysis of the binding of hepatitis C virus genotype 1a and 1b E2 glycoproteins to peripheral blood mononuclear cell subsets. *Journal of General Virology* **86**, 2507-2512.
- Ydreborg, M., Söderström, A., Håkanson, A., Alsiö, A., Arnholm, B., Malmström, P., Hellstrand, K., Westin, J. & Lagging, M. (2011).** Look-back screening for the identification of transfusion-induced hepatitis C virus infection in Sweden. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* **Epub ahead of print**.
- Yim, H. J. & Lok, A. S. F. (2006).** Natural History of Chronic Hepatitis B Virus Infection: What We Knew in 1981 and What We Know in 2005. *Hepatology* **43**, S173-S181.
- Ying, S. & Häcker, G. (2007).** Apoptosis induced by direct triggering of mitochondrial apoptosis proceeds in the near-absence of some apoptotic markers. *Apoptosis* **12**, 2003-2011.
- Yoffe, B., Noonan, C. A., Melnick, J. L. & Hollinger, F. B. (1986).** Hepatitis B virus DNA in mononuclear cells and analysis of cell subsets for the presence of replicative intermediates of viral DNA. *Journal of Infectious Diseases* **153**, 471-477.
- Zhang, C. X., Hu, J., Hu, K. W., Zhang, C., Wang, L. & Xu, J. M. (2011).** Noninvasive analysis of portal pressure by contrast-enhanced sonography in patients with cirrhosis. *J Ultrasound Med* **30**, 205-211.
- Zignego, A. L., Giannini, C., Monti, M. & Gragnani, L. (2007).** Hepatitis C virus lymphotropism: lessons from a decade of studies. *Digestive and Liver Disease* **39**, 38-45.