



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fakultät für Medizin

Lehrstuhl und Institut für Umweltmedizin, UNIKA-T

Direktorin: Prof. Dr. Claudia Traidl-Hoffmann

**Analyse des Darmmikrobioms HIV-positiver Patienten während des
Beginns der antiretroviralen Therapie**

Barbara Susanne Weichel

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Claudia Traidl-Hoffmann

2. Prof. Dr. Roland M. Schmid

Die Dissertation wurde am 22.10.2019 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 08.04.2020 angenommen.

Inhalt

| | |
|--|-----|
| Abkürzungsverzeichnis..... | V |
| Abbildungs- und Tabellenverzeichnis | VII |
| 1 Einleitung..... | 1 |
| 1.1 Der Beginn der AIDS-Epidemie | 1 |
| 1.2 Das HI-Virus | 2 |
| 1.3 Epidemiologie | 3 |
| 1.4 Übertragung..... | 4 |
| 1.5 Verlauf der Infektion..... | 5 |
| 1.6 Antiretrovirale Therapie..... | 7 |
| 1.7 Das menschliche Mikrobiom | 9 |
| 1.8 Schädigung der Darmmukosa bei HIV-Infektion | 12 |
| 1.9 Mikrobielle Translokation bei HIV | 12 |
| 1.10 Immunaktivierung und erhöhte Morbidität bei HIV | 14 |
| 1.11 Die Darmmikrobiota bei HIV-Patienten | 15 |
| 2 Ziel der Arbeit..... | 19 |
| 3 Material und Methoden..... | 21 |
| 3.1 Studienplanung..... | 21 |
| 3.2 Studienpopulation | 21 |
| 3.3 Datenschutz | 22 |
| 3.4 Studienablauf..... | 22 |
| 3.5 Datenerhebung | 23 |
| 3.6 Untersuchungsmaterial..... | 23 |
| 3.7 DNA-Isolierung..... | 24 |
| 3.8 DNA-Sequenzierung | 25 |

| | |
|--|----|
| 3.9 Sequenzanalyse..... | 25 |
| 3.10 Statistische Analyse..... | 26 |
| 4 Ergebnisse | 27 |
| 4.1 Patientenkollektiv | 27 |
| 4.2 Stuhlproben..... | 31 |
| 4.3 Interindividuelle Unterschiede des Mikrobioms | 33 |
| 4.4 Einfluss der ART auf das Mikrobiom | 33 |
| 4.5 Zusammenhang des Mikrobioms mit der CD4-Zellzahl | 37 |
| 4.6 Einfluss der Antibiotikatherapie auf das Mikrobiom | 38 |
| 5 Diskussion | 49 |
| 5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse..... | 49 |
| 5.2 Studiendesign..... | 49 |
| 5.3 Fallzahl | 50 |
| 5.4 Ein- und Ausschlusskriterien..... | 51 |
| 5.5 Studienablauf..... | 52 |
| 5.6 Datenerhebung..... | 52 |
| 5.7 Untersuchungsmaterial | 53 |
| 5.8 Einfluss der ART auf das Mikrobiom | 54 |
| 5.9 Effekt der Antibiotikatherapie | 57 |
| 5.10 Ausblick..... | 62 |
| 6 Zusammenfassung | 65 |
| 7 Abstract | 67 |
| Literaturverzeichnis..... | 68 |
| Anhang | 86 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------|---|
| 3TC | Lamivudin |
| AB | Antibiotikum |
| ABC | Abacavir |
| AIDS | Erworbenes Immundefektsyndrom (acquired immune deficiency syndrome) |
| ART | Antiretrovirale Therapie |
| CCR5 | C-C-Chemokinrezeptor Typ 5 |
| CD4/8 | Cluster of differentiation 4/8 |
| CDC | Centers for Disease Control and Prevention |
| DAIG | Deutsche AIDS-Gesellschaft |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid) |
| DRV | Darunavir |
| DTG | Dolutegravir |
| FTC | Emtricitabin |
| Gp | Glykoprotein |
| HIV | Humanes Immundefizienz-Virus |
| IFN | Interferon |
| IL | Interleukin |
| IMNGS | Integrated Microbial Next Generation Sequencing Platform |
| Inc. Sed. | Incertae Sedis (unsicherer Sitz) |
| INI | Integraseinhibitor |
| i.v. | intravenös |
| IZAR | Interdisziplinäres HIV-Zentrum am Klinikum rechts der Isar |
| LPS | Lipopolysaccharid |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------|---|
| MDS | Multidimensionale Skalierung |
| MSM | Männer, die Sex mit Männern haben |
| NMDS | Nicht-metrische multidimensionale Skalierung |
| NNRTI | Nicht-nukleosidischer Reverse-Transkriptase-Inhibitor |
| NOD | Nucleotide-binding oligomerization domain |
| NRTI | Nukleosidischer Reverse-Transkriptase-Inhibitor |
| NtRTI | Nukleotidischer Reverse-Transkriptase-Inhibitor |
| OTU | Operative Taxonomische Einheit (operational taxonomic unit) |
| PCP | Pneumocystis-Pneumonie |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction) |
| PI | Proteaseinhibitor |
| PI/c | Proteaseinhibitor, mit Cobocistat geboostert |
| PI/r | Proteaseinhibitor, mit Ritonavir geboostert |
| rDNA | ribosomale DNA |
| RLP | Rilpivirin |
| RNA | Ribonukleinsäure (ribonucleic acid) |
| rRNA | ribosomale RNA |
| RTV | Ritonavir |
| sCD14 | lösliches CD14 (soluble CD14) |
| SIV | Simianes Immundefizienz-Virus |
| Spp. | Spezies |
| TDF | Tenofovir |
| TLR | Toll-like-Rezeptor |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| z. B. | zum Beispiel |

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Aufbau des HI-Virus Schematische Abbildung nach (Doerr & Gerlich 2010) | 3 |
| Abbildung 2: Verlauf der HIV-Infektion ohne ART Schema übernommen aus (Hoffmann und Rockstroh 2016)..... | 5 |
| Abbildung 3: Ursachen und Folgen der mikrobiellen Translokation | 13 |
| Abbildung 4: zeitlicher Ablauf der Studie | 23 |
| Abbildung 5: CD4-Zellzahl der einzelnen Patienten im Studienverlauf, ausgenommen Patient 5 | 29 |
| Abbildung 6: Darstellung der Anzahl der reads und der Anzahl der detektierten OTUs für alle Proben | 32 |
| Abbildung 7: β -Diversität aller Proben im MDS-Plot; die Proben wurden nach Patienten gruppiert..... | 33 |
| Abbildung 8: Darstellung der α -Diversität mittels Artenvielfalt (richness); Abbildung aller Proben vor ART-Beginn (Visit 1) sowie nach 3, 6 und 9 Monaten (Visit 2, 3 und 4) | 34 |
| Abbildung 9: Darstellung der α -Diversität mittels effektiver Artenzahl berechnet aus dem Shannon-Index; Abbildung aller Proben vor ART-Beginn (Visit 1) sowie nach 3, 6 und 9 Monaten (Visit 2, 3 und 4)..... | 35 |
| Abbildung 10: β -Diversität der Proben von Patienten ohne Antibiotikatherapie im NMDS-Plot | 36 |
| Abbildung 11: Häufigkeit der Familie Ruminococcaceae nach Einnahme verschiedener NRTI; die Proben der Patienten nach Ceftriaxon und dreifacher Antibiotikatherapie wurden nicht berücksichtigt..... | 37 |
| Abbildung 12: Betrachtung der Artenvielfalt (richness) als Maß der α -Diversität; Darstellung aller Proben in Abhängigkeit der vorangegangenen Antibiotikatherapie; für den Vergleich der beiden ähnlichen Gruppen Cotrimoxazol und kein AB mit der Penicillin-Gruppe siehe Abbildung 14 | 39 |
| Abbildung 13: Betrachtung der effektiven Artenzahl berechnet aus dem Shannon-Index als Maß der α -Diversität; Darstellung aller Proben in Abhängigkeit der vorangegangenen | |

| | |
|--|----|
| Antibiotikatherapie; für den Vergleich der beiden ähnlichen Gruppen Cotrimoxazol und kein AB mit der Penicillin-Gruppe siehe Abbildung 15 | 39 |
| Abbildung 14: Vergleich der Artenvielfalt (richness) von Proben nach Penicillingabe mit Proben ohne vorangegangene Antibiotikatherapie oder nach Cotrimoxazol..... | 40 |
| Abbildung 15: Vergleich der effektiven Artenzahl (Shannon) von Proben nach Penicillingabe mit Proben ohne vorangegangene Antibiotikatherapie oder nach Cotrimoxazol..... | 41 |
| Abbildung 16: β -Diversität aller Proben im MDS-Plot; die Proben wurden entsprechend der vorangegangenen Antibiotikatherapie gruppiert..... | 42 |
| Abbildung 17: Zusammensetzung des Mikrobioms (Patient 07) vor Beginn der Antibiotikatherapie (Visit 1); mit * gekennzeichneten Taxa wurden der entsprechenden Familie zugeordnet, die Gattung ist unbekannt; inc sed.: incertae sedis..... | 43 |
| Abbildung 18: Zusammensetzung des Mikrobioms (Patient 07) 11 Tage nach Beginn der Antibiotikatherapie (Visit 2) | 44 |
| Abbildung 19: Zusammensetzung des Mikrobioms (Patient 07) 3 Monate nach Antibiotikatherapie (Visit 3); mit * gekennzeichneten Taxa wurden der entsprechenden Familie zugeordnet, die Gattung ist unbekannt..... | 45 |
| Abbildung 20: Zusammensetzung des Mikrobioms (Patient 07) 6 Monate nach Antibiotikatherapie (Visit 4); mit * gekennzeichneten Taxa wurden der entsprechenden Familie zugeordnet, die Gattung ist unbekannt; inc sed.: incertae sedis..... | 46 |
| Abbildung 21: Häufigkeit der Prevotellaceae unmittelbar nach Penicillingabe und 6-9 Monate später | 47 |
| | |
| Tabelle 1: CDC-Stadieneinteilung der HIV-Infektion (Herold 2016) | 6 |
| Tabelle 2: Übersicht über bisherige Studien zur Darmmikrobiota bei HIV | 16 |
| Tabelle 3: CDC-Stadium der Studienpatienten | 28 |
| Tabelle 4: Übersicht über Alter, Viruslast und CD4-Zellzahl der Studienteilnehmer | 28 |
| Tabelle 5: CD4-Zellzahl zum Zeitpunkt 0 | 28 |
| Tabelle 6: antiretrovirale Substanzen bei Therapie-Induktion | 30 |
| Tabelle 7: antiretrovirale Substanzen im Studienverlauf | 30 |
| Tabelle 8: Häufigkeit und Art der Antibiotikatherapie während der Studie | 31 |

1 Einleitung

1.1 Der Beginn der AIDS-Epidemie

Die ersten Berichte über einen bis dahin unbekanntem Immundefekt stammten aus den USA (Suttorp et al. 2016). Dort erkrankten im Jahr 1981 gehäuft junge Männer an opportunistischen Infektionen wie der Pneumonie durch *Pneumocystis jirovecii* (PCP), früher *Pneumocystis carinii* (Gottlieb et al. 1981; Masur et al. 1981; Siegal et al. 1981). Bei einigen dieser Patienten wurde ein Kaposi-Sarkom festgestellt (Gottlieb et al. 1981; Masur et al. 1981; Siegal et al. 1981), ein maligner Hauttumor, der mit einer Infektion durch das Humane Herpes Virus 8 assoziiert ist (Stürzl et al. 1997). Die Betroffenen waren homosexuell (Gottlieb et al. 1981; Masur et al. 1981; Siegal et al. 1981) oder hatten Kontakt mit Drogen (Masur et al. 1981) und waren zuvor gesund gewesen (Gottlieb et al. 1981; Siegal et al. 1981). Bei allen Patienten war die Zahl der Lymphozyten im Blut erniedrigt und es bestand ein Defekt der zellulären Immunität (Gottlieb et al. 1981; Masur et al. 1981; Siegal et al. 1981).

In der Folge wurden Fälle bei Patienten mit Hämophilie (Davis et al. 1983; Poon et al. 1983; Elliott et al. 1983), nach Bluttransfusionen (Curran et al. 1984; Jaffe et al. 1984) und bei Kindern bekannt (Oleske et al. 1983; Rubinstein et al. 1983; Scott et al. 1984). Auch die amerikanische Gesundheitsbehörde *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) berichtete über diese Fälle und fasste die Symptome als *acquired immune deficiency syndrome* (AIDS) zusammen (Centers for Disease Control 1982). Gleichzeitig wurden die ersten Fälle von AIDS bei Erwachsenen aus Zentralafrika bekannt (Piot et al. 1984; van de Perre et al. 1984; Clumeck et al. 1983).

Auf der Suche nach der Ursache der Erkrankung wurde unter anderem das humane T-lymphotrope Virus als Auslöser diskutiert (Essex et al. 1983a; Essex et al. 1983b; Gallo et al. 1983). Der Nachweis des später in Humanes Immundefizienz-Virus Typ 1 (HIV-1) umbenannten Virus gelang 1983 der Forschergruppe von Luc Montagnier vom Institut Pasteur in Paris (Barre-Sinoussi et al. 1983). Drei Jahre später wurde HIV-2 bei einer Person aus Westafrika entdeckt (Clavel et al. 1986).

1.2 Das HI-Virus

1.2.1 Ursprung

Das älteste Blutserum, in dem HIV-1 nachgewiesen wurde, stammt von einer Person aus dem heutigen Kongo aus dem Jahr 1959 (Zhu et al. 1998). Es wird angenommen, dass HIV-1 M von einem mit dem Simianen Immundefizienz-Virus (SIV) infizierten Schimpansen in Afrika auf den Menschen übertragen wurde (Gao et al. 1999). Varianten des SIV konnten bei zahlreichen Affenarten nachgewiesen werden. Mehrere unabhängige Übertragungen führten beim Menschen zu Infektionen mit verschiedenen Subtypen des Virus. Ein möglicher Übertragungsweg ist der Kontakt mit SIV-haltigem Blut bei der Jagd von Affen (Hahn 2000).

1.2.2 Einordnung

Das HI-Virus gehört zur Gattung der Lentiviren innerhalb der Familie der Retroviren (Kayser et al. 2014). Es sind die beiden Typen HIV-1 und HIV-2 bekannt. HIV-1 wird in die vier Gruppen M, N und O und P unterteilt (Kayser et al. 2014). Mehr als 98 % der weltweit isolierten HI-Viren gehören zur Gruppe HIV-1M (Knipe & Howley 2013). Die neun Subtypen (A-D, F-H, J, K) der Gruppe M sind geographisch unterschiedlich verteilt (Kayser et al. 2014). HIV-2 kommt vor allem in Westafrika vor (Kayser et al. 2014). Da es weltweit nur einen geringen Anteil der Infektionen verursacht, konzentrieren sich die folgenden Kapitel auf die Infektion mit HIV-1.

1.2.3 Morphologie

Das Viruspartikel ist in etwa 100 - 150 nm groß und von einer Hülle aus Lipoprotein umgeben (Abbildung 1); in diese Hülle ist das Transmembranprotein Glykoprotein (gp) 41 eingelagert, an welches das äußere Hüllprotein gp120 gebunden ist (Doerr & Gerlich 2010). Da die Hülle von der Wirtszelle stammt, enthält sie auch zelluläre Proteine wie Humane Leukozytenantigen-Moleküle der Klasse I und II. Das Kapsid besteht aus dem p24-Antigen und enthält zwei Kopien des einzelsträngigen RNA-Genoms. Im Viruspartikel sind die für die Replikation benötigten Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase und Protease enthalten (Doerr & Gerlich 2010). Diese Enzyme sind mögliche Angriffspunkte antiretroviraler Medikamente im Replikationszyklus des Virus (Hoffmann & Rockstroh 2016).

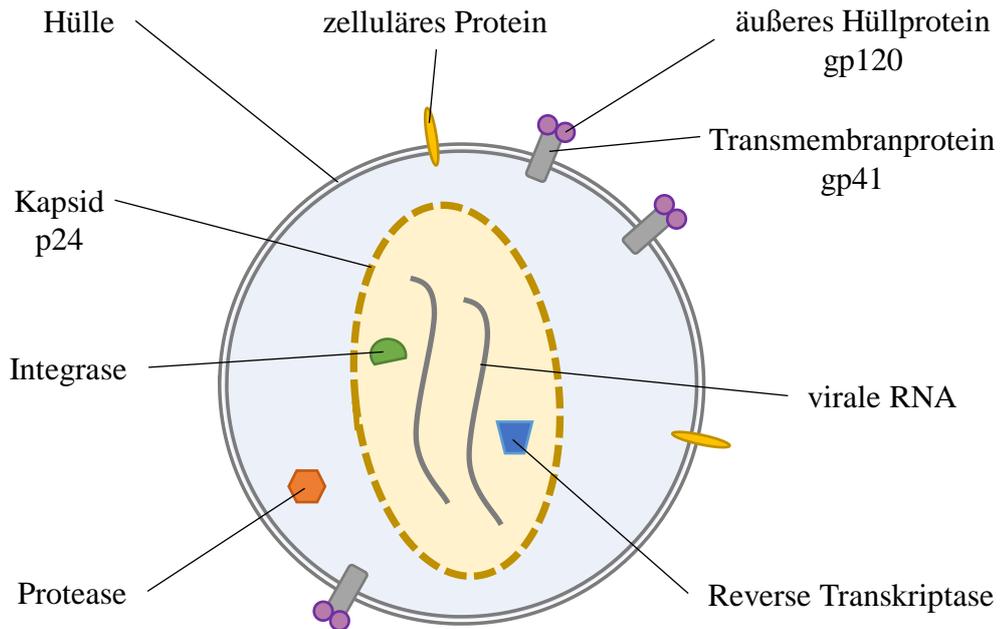


Abbildung 1: Aufbau des HI-Virus

Schematische Abbildung nach (Doerr & Gerlich 2010)

1.3 Epidemiologie

1.3.1 Global

Nach Schätzung des gemeinsamen Programms der Vereinten Nationen zu HIV/AIDS waren im Jahr 2015 weltweit 36,7 Millionen Menschen mit dem HI-Virus infiziert (UN Joint Programme on HIV/AIDS (UNAIDS) 2016). Davon lebten 19,0 Millionen Menschen in Ost- und Südafrika, der am stärksten betroffenen Region der Welt. In Westeuropa, Zentraleuropa und Nordamerika lebten insgesamt 2,4 Millionen Menschen mit HIV. Weltweit gab es 2,1 Millionen Neuinfektionen. Die Zahl der Menschen mit HIV, die eine antiretrovirale Therapie (ART) erhielt, war seit 2010 von 7,5 Millionen auf 17,0 Millionen gestiegen. Gleichzeitig wurde ein Rückgang der Todesfälle durch AIDS von 1,5 Millionen auf 1,1 Millionen beobachtet (UN Joint Programme on HIV/AIDS (UNAIDS) 2016).

1.3.2 Deutschland

Die Berechnungen des Robert-Koch-Instituts ergaben, dass im Jahr 2015 in Deutschland > 84.700 Menschen mit HIV lebten. Diese Zahl setzt sich aus den Zahlen der Menschen mit HIV-Diagnose (72.100) und ohne Diagnose (> 12.600) zusammen. Der Anteil der Männer lag mit 82 % deutlich über dem der Frauen, da der häufigste Infektionsweg der Sex zwischen Männern war. Die Zahl der Neuinfektionen war um das Jahr 1985 am größten und fiel bis Ende der 1990er-Jahre stark ab. Darauf folgte ein erneuter Anstieg in den Jahren 2000 bis 2006. Seitdem hat es keine entscheidende Veränderung der Zahl der Neuinfektionen gegeben. Für das Jahr 2015 wurde sie auf 3.200 geschätzt. Bei Unterteilung der Neuinfektionen in Transmissionsgruppen entsprechend dem Übertragungsweg waren in etwa 69 % Männer, die Sex mit Männern haben (MSM), 13 % Frauen und 10 % Männer, die sich auf heterosexuellem Weg infiziert hatten. Etwa 8 % der Neuinfektionen waren durch den gemeinsamen Nadelgebrauch unter intravenös drogenabhängigen Menschen verursacht (Robert Koch-Institut 2016). Der Anteil der Personen, die eine ART erhielt, war im Jahr 2015 auf 84 % der Personen mit HIV-Diagnose angestiegen. Damit erhielten 60.700 Personen eine ART. Im Jahr 2006 lag der Anteil noch bei 73 % (Robert Koch-Institut 2016).

1.4 Übertragung

Weltweit ist heterosexueller Geschlechtsverkehr der häufigste Übertragungsweg (Suttorp et al. 2016). In Deutschland entstehen die meisten Neuinfektionen bei MSM (Robert Koch-Institut 2016). Die Wahrscheinlichkeit einer Übertragung durch Geschlechtsverkehr wird von der Viruslast im Blut der Kontaktperson, dem Vorliegen anderer Geschlechtskrankheiten und den sexuellen Praktiken beeinflusst, da Schleimhautläsionen eine Übertragung des Virus begünstigen (Doerr & Gerlich 2010). Weitere wichtige Übertragungswege sind der gemeinsame Nadelgebrauch unter intravenös drogenabhängigen Menschen und die Übertragung von der Mutter auf das Kind (Doerr & Gerlich 2010).

1.5 Verlauf der Infektion

1.5.1 T-Helferzellen und Viruslast

Die Viruslast entspricht der Menge der HIV-1-Genkopien pro Milliliter Blutplasma (Kayser et al. 2014). Wie in Abbildung 2 dargestellt, steigt die Viruslast in der akuten Phase der Infektion massiv an. Der darauffolgende Abfall beruht auf der Antwort zytotoxischer T-Zellen des Immunsystems (Kayser et al. 2014). Diese Reduktion der Viruslast ist prognostisch relevant, da niedrige Werte mit einem langsameren Krankheitsprogress und einem langen Intervall ohne Symptome einer AIDS-Erkrankung assoziiert sind (O'Brien et al. 1996). Die Zerstörung von CD4-positiven T-Helferzellen durch das HI-Virus führt zu einem sukzessiven Absinken der Anzahl an T-Helferzellen und somit zur Schädigung des Immunsystems (Herold 2016). Gleichzeitig fällt auch das Verhältnis von T-Helfer- zu T-Suppressorzellen (CD4/CD8-Ratio) (Herold 2016). Der Normbereich der CD4-Zellzahl liegt für Erwachsene laborabhängig zumeist bei 435-1600/ μl (Hoffmann & Rockstroh 2016). Bei einem Abfall der CD4-Zellzahl unter 200/ μl muss mit dem Auftreten AIDS-definierender Erkrankungen gerechnet werden (Hoffmann & Rockstroh 2016). Die Virämie und damit die Infektiosität ist in der frühen Phase der Infektion und im späten AIDS-Stadium am höchsten (Herold 2016).

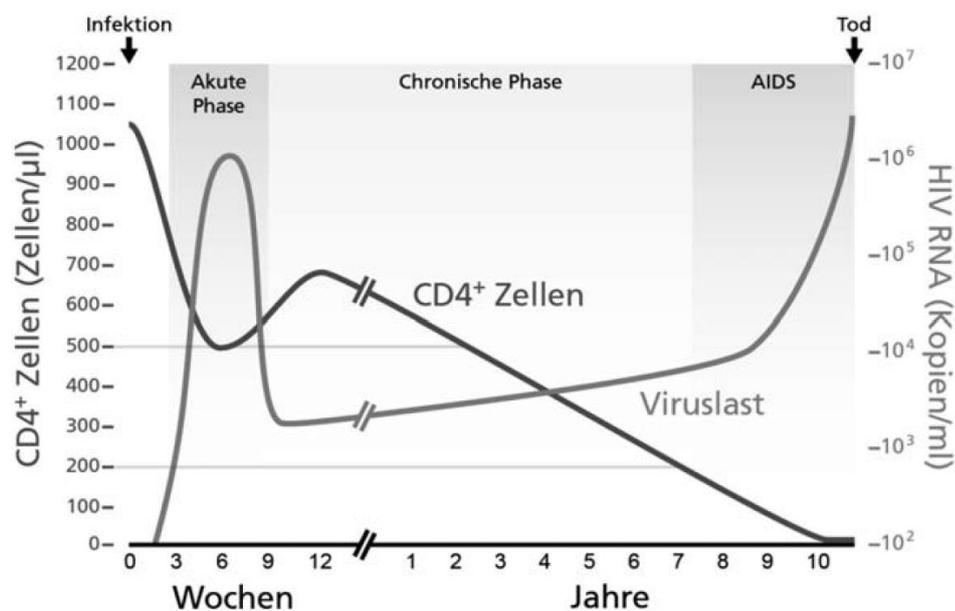


Abbildung 2: Verlauf der HIV-Infektion ohne ART

Schema übernommen aus (Hoffmann und Rockstroh 2016)

1.5.2 Stadieneinteilung

Die Stadieneinteilung der HIV-Infektion ist in Tabelle 1 dargestellt. Sie erfolgt nach der Klassifikation der CDC aus dem Jahr 1993 anhand der klinischen Symptome in die Kategorien A-C und anhand der CD4-Zellzahl in die Gruppen 1-3 (Herold 2016). Bei Krankheitsprogress wird das Stadium angepasst, allerdings findet keine Zurückstufung bei immunologischer Erholung statt (Herold 2016).

Die akute HIV-Krankheit kann wenige Wochen nach Erstinfektion auftreten und wird der klinischen Kategorie A zugeordnet. Das Krankheitsbild umfasst unter anderem Fieber und Lymphknotenschwellungen. Zur Kategorie A gehören außerdem die asymptomatische Infektion (Latenzphase) und das Lymphadenopathie-Syndrom, welches durch persistierende, generalisierte Lymphknotenschwellungen charakterisiert ist (Herold 2016).

Zu den nicht-AIDS-definierenden Erkrankungen der Kategorie B werden unter anderem Symptome wie subfebrile Temperaturen, chronische Diarrhö, Infektionen durch *Candida albicans* oder *Herpes zoster* (multisegmental oder rezidivierend) und bestimmte Malignome gezählt (Herold 2016).

Zu den AIDS-definierenden Krankheiten der Kategorie C gehören z. B. das Wasting-Syndrom, opportunistische Infektionen wie die PCP und Malignome wie das Kaposi-Sarkom (Herold 2016).

Tabelle 1: CDC-Stadieneinteilung der HIV-Infektion (Herold 2016)

| CD4/ μ l | Klinische Kategorien | | |
|--------------|--|--------------------------------------|---------------------------------------|
| | A Asymptomatisch Akute HIV-Krankheit Lymphadenopathie-Syndrom | B Symptomatisch Weder A noch C | C AIDS-definierende Krankheiten |
| ≥ 500 | A1 | B1 | C1 |
| 200-499 | A2 | B2 | C2 |
| < 200 | A3 | B3 | C3 |

1.6 Antiretrovirale Therapie

Die aktuellen Leitlinien zur antiretroviralen Therapie der HIV-Infektion wurden von der Deutschen AIDS-Gesellschaft auf Basis der Konferenz vom 11.12.2015 veröffentlicht (Deutsche AIDS-Gesellschaft (DAIG) 2015).

1.6.1 Behandlungsbeginn

Eine eindeutige Behandlungsindikation liegt bei einer akuten Infektion mit schweren oder langanhaltenden Symptomen vor, wenn die HIV-Infektion symptomatisch im CDC-Stadium B oder C ist oder die CD4-Zellzahl im Blut $< 500/\mu\text{l}$ beträgt. Je niedriger die CD4-Zellzahl, desto schneller sollte eine Therapie eingeleitet werden. Bei Werten $< 200/\mu\text{l}$ sind Morbidität und Mortalität auch unter ART erhöht (Deutsche AIDS-Gesellschaft (DAIG) 2015). Verschiedene Studien zeigten, dass bei < 500 CD4-Zellen/ μl ein früherer Therapiebeginn das Progressrisiko vermindern kann (Cain et al. 2011; Phillips et al. 2007; The CASCADE Collaboration 2011).

Auch bei Patienten mit einer CD4-Zellzahl $> 500/\mu\text{l}$ ist die Therapie indiziert (Deutsche AIDS-Gesellschaft (DAIG) 2015). Gegenüber einem späteren Behandlungsbeginn wurde ein signifikanter Vorteil bezüglich dem Auftreten von schweren Ereignissen nachgewiesen (Lundgren et al. 2015). Eine weitere Studie zeigte, dass ein unmittelbarer ART-Beginn auch bei Patienten mit > 500 CD4-Zellen/ μl das Risiko für schwere bakterielle Infektionen reduziert (O'Connor et al. 2017). Die Empfehlung zur Behandlung ist jedoch weniger dringlich als bei Patienten mit einer CD4-Zellzahl $< 500/\mu\text{l}$ (Deutsche AIDS-Gesellschaft (DAIG) 2015).

Ein früherer Therapiebeginn wird bei Schwangerschaft, Hepatitis-Koinfektion, höherem Lebensalter, Immunsuppression oder raschem Absinken der CD4-Zellzahl empfohlen (Deutsche AIDS-Gesellschaft (DAIG) 2015).

1.6.2 Empfohlene Substanzen

Zur Initialtherapie werden nukleosidische bzw. nukleotidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI/NtRTI), nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTI), Integrase-Inhibitoren (INI) und Protease-Inhibitoren (PI) eingesetzt. Letztere werden für eine stärkere Wirkung immer mit Ritonavir (PI/r) oder Cobicistat (PI/c)

geboostert. Es wird die Kombination aus 2 NRTI plus einem NNRTI oder INI oder geboostertem PI empfohlen (Deutsche AIDS-Gesellschaft (DAIG) 2015). Eine weitere Substanzklasse stellen die Entryinhibitoren dar. Dazu gehört der CCR5-Inhibitor Maraviroc und der Fusionsinhibitor Enfuvirtid. Beide werden für die Initialtherapie nicht empfohlen (Deutsche AIDS-Gesellschaft (DAIG) 2015).

1.6.3 Wirkung der ART auf Viruslast und Immunsystem

In den ersten zwei Wochen nach Beginn der ART fällt die Konzentration des HI-Virus im Blutplasma in der Regel um circa 99 % ab; danach sinkt die Plasmavirämie langsamer (Perelson et al. 1997). Nach 3 bis 4 Monaten sollte die Viruslast unter 50 Kopien pro Milliliter liegen; bei initial sehr hoher Viruslast sollte dies nach spätestens 6 Monaten erreicht sein (Deutsche AIDS-Gesellschaft (DAIG) 2015).

Auch der Anstieg der CD4-Zellen nimmt häufig einen biphasischen Verlauf. Wichtigster Faktor für die Immunrestitution ist das virologische Ansprechen (Kaufmann et al. 2000). In einer weiteren Studie mit mehr als 1200 Patienten zeigte sich im Durchschnitt ein stärkerer Anstieg in den ersten drei Monaten nach Therapiebeginn (21 CD4/ μ l pro Monat) als in der darauffolgenden Zeit (5,5 CD4/ μ l pro Monat, Monat 4 bis 24). Entscheidend für den Anstieg war die Virussuppression (Le Moing et al. 2002).

Die Wiederherstellung der CD4-Zellzahl ist zudem von deren Stand zu Therapiebeginn abhängig. Es wurde gezeigt, dass mit einem höheren Ausgangswert die Wahrscheinlichkeit steigt, innerhalb von vier Jahren eine CD4-Zellzahl von 500/ μ l zu erreichen (Kaufmann et al. 2003). Auch über einen Zeitraum von sechs Jahren wurden nahezu normale Werte nur von Patienten erreicht, deren CD4-Zellzahl initial über 350/ μ l lag (Moore & Keruly 2007). Bei älteren Patienten erfolgt der Anstieg langsamer als bei jüngeren Patienten (Grabar et al. 2004; Kaufmann et al. 2003).

1.6.4 Nebenwirkungen der ART

Insgesamt treten Nebenwirkungen heute deutlich seltener und weniger ausgeprägt auf als bei früheren Präparaten (Hoffmann & Rockstroh 2016). Damit ist auch der Wechsel der ART aufgrund von Nebenwirkungen seltener geworden (Cicconi et al. 2010). Zu den wichtigsten Nebenwirkungen gehören neben Hepatotoxizität, renalen Komplikationen, allergischen Reaktionen und Hautveränderungen auch gastrointestinale Beschwerden

(Hoffmann & Rockstroh 2016). Besonders bei Therapiebeginn mit PI/r, aber auch mit INI können Diarrhöen auftreten (Hoffmann & Rockstroh 2016). Weitere Nebenwirkungen der ART sind metabolische Veränderungen und Fettverteilungsstörungen (Hoffmann & Rockstroh 2016). Die Symptome der peripheren Lipodystrophie, Hyperlipidämie und Insulinresistenz wurden als Lipodystrophie-Syndrom zusammengefasst (Carr et al. 1998) und traten besonders unter früher eingesetzten PI (Carr et al. 1998; Nolan 2003) und NRTI (Galli et al. 2002) auf. Unter neueren antiretroviralen Substanzen haben diese Symptome abgenommen (Srinivasa & Grinspoon 2014).

1.7 Das menschliche Mikrobiom

Die Gesamtheit aller Mikroorganismen, die den menschlichen Körper besiedeln, wird als menschliche Mikrobiota oder menschliches Mikrobiom (Lederberg & McCray 2001) bezeichnet. Im engeren Sinne versteht man unter dem Mikrobiom die Gesamtheit aller Gene bzw. Genome dieser Mikroorganismen (Kuczynski et al. 2012). Sie kolonialisieren die Regionen des menschlichen Körpers, die im Kontakt mit der Umwelt stehen: den Verdauungstrakt, die Mundhöhle, die Haut, sowie Teile der Atemwege und des Urogenitaltrakts (Madigan et al. 2013). In der Regel konzentrieren sich Untersuchungen des Mikrobioms auf die Zusammensetzung der Bakterien. Der menschliche Körper wird darüber hinaus von Pilzen und Viren besiedelt, deren Charakterisierung ebenso Gegenstand aktueller Studien ist.

1.7.1 Die Mikrobiomanalyse

Ein Großteil der mikrobiellen Gemeinschaft, die den menschlichen Körper besiedelt, ist nicht durch *in vitro* Kultivierung nachweisbar (Cho & Blaser 2012). Erst durch die Entwicklung molekularer Methoden zur Analyse bakterieller DNA und die Bereitstellung bekannter Sequenzen in großen Datenbanken wurde die Analyse des menschlichen Mikrobioms möglich (Cho & Blaser 2012). Forschungsprojekte wie das *Human Microbiome Project* wurden gegründet, um die Frage nach einem menschlichen Kernmikrobiom und Zusammenhänge mit Erkrankungen zu untersuchen (Turnbaugh et al. 2007). Für die Sequenzierung der bakteriellen DNA gibt es zwei verschiedene Ansätze. Bei der gezielten Amplikon-Sequenzierung werden einzelne Gene der Bakterien

zur phylogenetischen Analyse sequenziert. Häufig wird hierfür das 16S rRNA-Gen gewählt, da ribosomale Gene in allen Organismen vorhanden sind (Kuczynski et al. 2012). Sie enthalten sowohl konservierte Regionen, die sich für die Bindung des Primers eignen, als auch variable Regionen für die genaue Klassifikation der Organismen (Kuczynski et al. 2012). Die Methode ermöglicht eine quantitative Untersuchung der Vielfalt mikrobieller Gemeinschaften wie z. B. der menschlichen Darmmikrobiota (Singer et al. 2016). Die alternative Vorgehensweise ist die Schrotschuss-Metagenomik, bei der die gesamte DNA einer Umweltprobe analysiert wird. Der Begriff „Schrotschuss“ nimmt Bezug auf die willkürliche Fragmentierung der DNA vor der Sequenzierung (Kuczynski et al. 2012). Dem Vorteil einer umfassenderen Abbildung der vorhandenen Mikroorganismen steht der höhere Aufwand der Sequenzierung gegenüber (Ranjan et al. 2016).

1.7.2 Die Darmmikrobiota

Die Zahl der Bakterien ist im Bereich des Colons größer als in den weiter proximal gelegenen Abschnitten des Verdauungstrakts und liegt in etwa bei 10^{11} bis 10^{12} pro Gramm Darminhalt (Madigan et al. 2013). Das Verhältnis von anaeroben zu fakultativ anaeroben Bakterien liegt bei 1000 : 1 (Slonczewski & Foster 2012). Die meisten Bakterien gehören zu den Phylae Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria und Actinobacteria. Unter den Firmicutes sind die Familie der Lachnospiraceae und Ruminococcaceae der Klasse Clostridia am häufigsten (Madigan et al. 2013). Bei Betrachtung der Gattungen und Arten ist die Vielfalt der Bakterien groß und die Mikrobiota unterscheidet sich stark zwischen verschiedenen Individuen (Eckburg et al. 2005). Eine Studie konnte die Mikrobiota jedoch in drei Gruppen einteilen, die als Enterotypen bezeichnet wurden und nicht von Alter, Geschlecht oder Body-Mass-Index der Probanden abhängig waren (Arumugam et al. 2011). Jeder Enterotyp ist durch eine hohe Abundanz einer der drei Gattungen *Bacteroides*, *Prevotella* oder *Ruminococcus* definiert. Zudem wurden weitere charakteristische Gattungen für jeden Enterotyp identifiziert. Da diese Gattungen unterschiedliche Stoffwechselwege zur Energiegewinnung bevorzugen, wird angenommen, dass sich auch die Enterotypen hierdurch unterscheiden. So wurde etwa gezeigt, dass die Biosynthese mehrerer Vitamine zwischen den Enterotypen unterschiedlich stark ausgeprägt ist (Arumugam et al. 2011).

1.7.3 Wechselbeziehung zwischen Mensch und Darmmikrobiota

Im Darm besteht eine enge Interaktion zwischen Epithel, Immunsystem und Mikrobiota. Das Darmepithel dient als physiologische und biochemische Barriere zwischen Mikroorganismen und dem systemischen Kreislauf (Geuking et al. 2014). Durch Tight Junctions der Enterozyten entsteht eine Diffusionschranke zwischen dem Darmlumen und dem Körperinneren. Die im Epithelverband liegenden Becherzellen produzieren Muzine, die einen schützenden Schleimteppich bilden (Lüllmann-Rauch & Asan 2015). Im Kolon besteht dieser aus einer äußeren, von Bakterien besiedelten Schicht und einer inneren Schicht, die frei von Bakterien ist (Johansson et al. 2008). Die innere Schicht haftet dem Epithel fest an und enthält antimikrobielle Peptide und Immunglobulin A (Lüllmann-Rauch & Asan 2015). Jedoch wird in einem gesunden Organismus durch die omnipräsenten Mikroorganismen und Antigene der Darmflora keine dauerhafte, entzündliche Reaktion des Immunsystems ausgelöst (Haller & Hörmannspurger 2015). Während die Darmbakterien von einem geschützten, nährstoffreichen Lebensraum profitieren, trägt ihre Besiedelung gleichzeitig zu einer Exklusion von potentiellen Pathogenen bei (Haller & Hörmannspurger 2015). Außerdem leisten die Mikroorganismen durch Synthese verschiedener Enzyme einen wichtigen Beitrag zum Metabolismus des Menschen (Madigan et al. 2013).

1.7.4 Dysbiose bei chronischen Erkrankungen

Die Störung des Gleichgewichts zwischen den Bakterienarten im Darm wird als Dysbiose bezeichnet (Kunkel-Razum et al. 2015). Bei verschiedenen chronischen Erkrankungen konnten charakteristische Veränderungen der Mikrobiota identifiziert werden. Insbesondere im Zusammenhang mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wurde eine verminderte Diversität (Manichanh et al. 2006) und eine veränderte Zusammensetzung beschrieben (Frank et al. 2007). Bei Adipositas fanden sich sowohl im Mausmodell als auch beim Menschen Veränderungen in der Zusammensetzung und im Stoffwechsel der Darmmikrobiota (Ley et al. 2005; Ley et al. 2006). Auch für die Entstehung des kolorektalen Karzinoms (Castellarin et al. 2012; Kostic et al. 2012) und der rheumatoiden Arthritis (Vaahтовuo et al. 2008; Jethwa & Abraham 2016) wird ein Zusammenhang mit der Darmmikrobiota angenommen. Die Untersuchung des Darmmikrobioms bei Patienten mit Leberzirrhose zeigte im Vergleich zu gesunden

Individuen eine Verminderung des Phylum Bacteroidetes und der Gattung *Bacteroides*. Gleichzeitig waren Proteobacteria und Fusobacteria vermehrt (Qin et al. 2014). Bei Patienten mit Diabetes wurde eine signifikante Zunahme aerober Bakterien und eine Reduktion von *Bifidobacterium* spp. nachgewiesen (Vamanu et al. 2016). Für die Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen wurde der Stoffwechsel der Darmmikrobiota als relevanter Faktor identifiziert (Wang et al. 2011).

1.8 Schädigung der Darmmukosa bei HIV-Infektion

Schon in der frühen Phase der HIV-Infektion kommt es zu einem ausgeprägten Verlust von CD4-Zellen in der Mukosa des Gastrointestinaltrakts (Mattapallil et al. 2005; Veazey et al. 1998; Guadalupe et al. 2003; Brenchley et al. 2004; Mehandru et al. 2004). Im Gegensatz zu CD4-Zellen im peripheren Blut exprimieren diese mehrheitlich den HIV-Korezeptor CCR5 (Brenchley et al. 2004). Der signifikante Verlust von Interleukin (IL) 17- und IL-22-produzierenden CD4-Zellen (Th17-Zellen) (Brenchley et al. 2008) führt zur Schädigung der Darmmukosa (Klatt et al. 2012). Nach Beginn der ART verläuft der Anstieg der CD4-Zellen im Darm verzögert und es kommt zu einer inkompletten Wiederherstellung (Guadalupe et al. 2003).

Die strukturelle Schädigung der Darmmukosa bei HIV-Patienten wurde bereits 1984 in einer Studie beschrieben (Kotler et al. 1984). Durch die Apoptose von Enterozyten kommt es zur Störung der Tight Junctions und in der Folge zu einer Erhöhung der Permeabilität (Sandler & Douek 2012). Durch die Schädigung des Epithels treten bakterielle Produkte aus dem Darmlumen in den systemischen Kreislauf über (Estes et al. 2010; Nazli et al. 2010). Dieser Vorgang wird als „mikrobielle Translokation“ bezeichnet.

1.9 Mikrobielle Translokation bei HIV

Die fortgeschrittene HIV-Infektion ist durch eine chronische Aktivierung des Immunsystems gekennzeichnet (Brenchley et al. 2006). Dies zeigt sich in einem gesteigerten Umsatz der T-Zellen (Hellerstein et al. 1999), einer vermehrten Proliferation der T-Zellen (Hazenbergh et al. 2000) und einer Erhöhung der proinflammatorischen

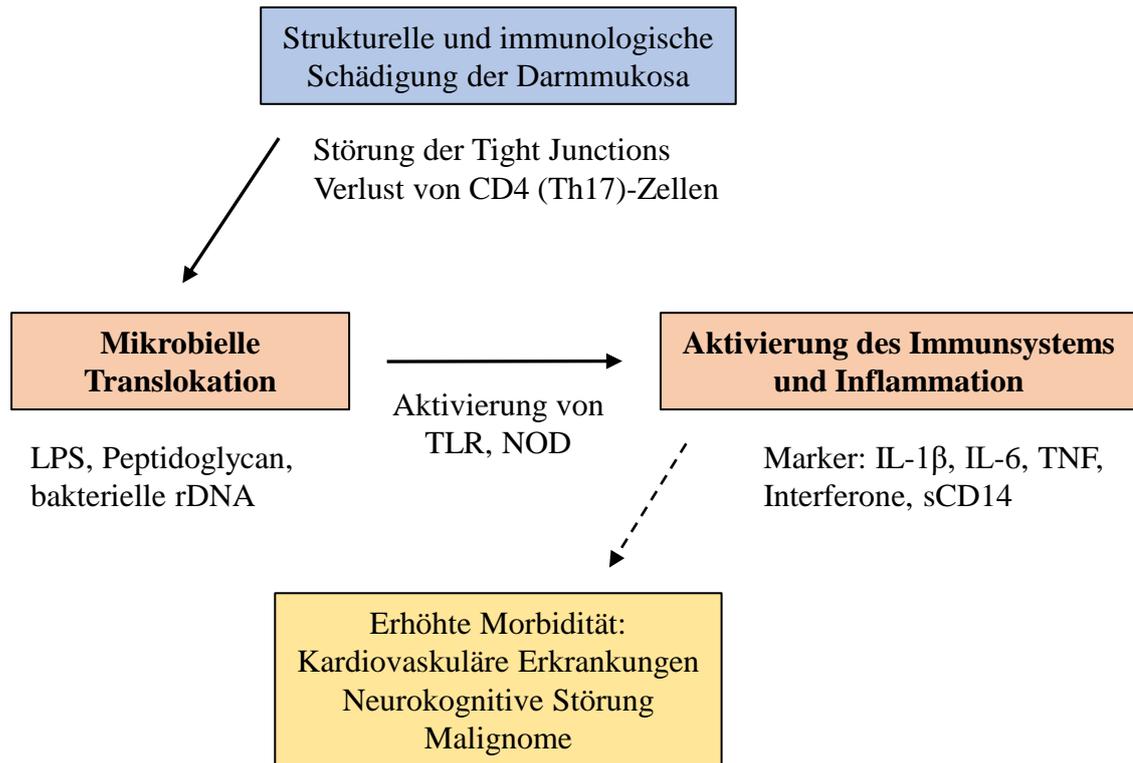


Abbildung 3: Ursachen und Folgen der mikrobiellen Translokation

Mediatoren im peripheren Blut (Valdez & Lederman 1997-1998). Die T-Zell-Aktivierung korreliert mit einer kürzeren Überlebenszeit und sagt damit den Krankheitsverlauf besser vorher als die Viruslast (Giorgi et al. 1999).

Die Gruppe von Brenchley et al. konnte zeigen, dass die Translokation mikrobieller Produkte eine wichtige Ursache der gesteigerten Immunaktivierung bei HIV-Patienten ist. Dabei korrelierte Lipopolysaccharid im Blut mit der Immunaktivierung, welche durch zirkulierendes IFN-alpha und die Häufigkeit aktivierter T-Zellen quantifiziert wurde (Brenchley et al. 2006).

Neben LPS treten weitere bakterielle Produkte in die Blutbahn über und wirken proinflammatorisch. Dazu gehören unter anderem Peptidoglycan (Clarke et al. 2010) und bakterielle rDNA, welche die 16S-RNA kodiert (Jiang et al. 2009). Durch die Bindung an Toll-like-Rezeptoren (TLR) und Nucleotide-binding oligomerization domain 1 (NOD1) und NOD2 wird eine Signalkaskade aktiviert, die zur Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β , IL-6, TNF und Interferonen führt (Sandler & Douek 2012).

Des Weiteren wurde bei HIV-Patienten im Vergleich mit HIV-negativen Personen mehrfach eine Erhöhung von löslichem CD14 (sCD14) im Plasma nachgewiesen (Brenchley et al. 2006; Lien et al. 1998). Die Werte waren bei Patienten mit klinisch und immunologisch fortgeschrittener Erkrankung am höchsten (Lien et al. 1998). Bei fortgeschrittener Erkrankung bestand eine signifikante Korrelation zwischen LPS und sCD14-Spiegeln im Plasma (Brenchley et al. 2006). Lösliches CD14 wird von Zellen der angeborenen Immunantwort sezerniert und dient als Marker der LPS-induzierten Monozyten-/Makrophagenaktivierung (Sandler & Douek 2012).

Eine Übersicht über die Ursachen und möglichen Folgen des Übertritts mikrobieller Produkte in den systemischen Kreislauf gibt Abbildung 3.

1.10 Immunaktivierung und erhöhte Morbidität bei HIV

Unabhängig von einer HIV-Infektion sind kardiovaskuläre Erkrankungen (Hansson & Hermansson 2011) und Malignome (Grivennikov & Karin 2011) mit einer Erhöhung proinflammatorischer Zytokine assoziiert. Gleichzeitig haben Menschen mit HIV auch unter ART ein erhöhtes Risiko für Erkrankungen, die nicht im Zusammenhang mit AIDS stehen. So besteht unter anderem ein erhöhtes Risiko für den akuten Myokardinfarkt (Freiberg et al. 2013). Aufgrund des Zusammenhangs zwischen erhöhtem sCD14 und LPS im Serum und dem Progress von Atherosklerose wird die mikrobielle Translokation als möglichen Faktor in der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen bei HIV betrachtet (Kelesidis et al. 2012).

Auch das Krebsrisiko ist bei HIV-Patienten erhöht. Nicht nur AIDS-definierenden Malignome, sondern auch das Hodgkin-Lymphom, Lungenkrebs und Lebertumoren treten häufiger auf als bei HIV-negativen Personen (Engels et al. 2008).

Es konnte gezeigt werden, dass die neurokognitive Beeinträchtigung bei HIV-Patienten mit höheren sCD14-Spiegeln assoziiert ist (Lyons et al. 2011) und die stärker ausgeprägte HIV-assoziierte Demenz mit erhöhtem LPS, einem Biomarker der mikrobiellen Translokation (Ancuta et al. 2008).

1.11 Die Darmmikrobiota bei HIV-Patienten

Bisherige Studien weisen darauf hin, dass sich die Darmmikrobiota bei HIV-Patienten im Vergleich zu Menschen ohne HIV unterscheidet. Unterschiede fanden sich sowohl bei der Diversität als auch bei der Abundanz einzelner Taxa. Im Hinblick auf die genauen Veränderungen weichen die Ergebnisse jedoch deutlich voneinander ab. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Fallzahl, das Untersuchungsmaterial und den Therapiestatus der Patienten bisheriger Studien. Eine vorangegangene Antibiotikatherapie wurde in mehreren Studien als Ausschlusskriterium definiert (Pérez-Santiago et al. 2013; Nowak et al. 2015). Das Zeitintervall variierte hierbei je nach Studie zwischen einem Monat (Ling et al. 2016) und drei Monaten vor Studieneinschluss (Dillon et al. 2014; Vazquez-Castellanos et al. 2015; Dubourg et al. 2016).

1.11.1 Diversität

In der Mehrzahl der Studien war die α -Diversität bei HIV-Patienten niedriger als bei gesunden Kontrollpersonen. Dies wurde bei Patienten mit unterschiedlichem ART-Status beobachtet (McHardy et al. 2013; Mutlu et al. 2014; Dubourg et al. 2016). Je nach Studie glichen die α - und β -Diversität bei HIV-Patienten unter ART der von HIV-negativen Kontrollen (McHardy et al. 2013) oder von unbehandelten HIV-Patienten (Dubourg et al. 2016).

Andere Gruppen fanden keinen Unterschied der α -Diversität zwischen gesunden Kontrollen und HIV-Patienten mit und ohne ART (Vujkovic-Cvijin et al. 2013; Dillon et al. 2014; Dinh et al. 2015; Ling et al. 2016). In einer einzelnen Studie war die α -Diversität bei unbehandelten Patienten im Vergleich zu HIV-negativen Kontrollen erhöht (Lozupone et al. 2013). Dass auch die sexuelle Praktik die α -Diversität beeinflusst, ging aus einer Studie hervor, in der die Diversität bei MSM im Vergleich zu nicht-MSM größer war; bei Berücksichtigung der Transmissionsgruppe war die Diversität bei HIV reduziert (Noguera-Julian et al. 2016).

Es liegen sowohl Ergebnisse vor, wonach sich die β -Diversität des Mikrobioms bei unbehandelten HIV Patienten und HIV-negativen Kontrollen unterschied (Lozupone et al. 2013; McHardy et al. 2013), als auch solche, die keinen Unterschied feststellen konnten (Monaco et al. 2016).

Tabelle 2: Übersicht über bisherige Studien zur Darmmikrobiota bei HIV

| Studie | HIV+ N | Untersuchungsmaterial | ART -/+ |
|---------------------------------|-----------|---|-------------------------------------|
| Gori et al. 2008 | 57 | Stuhlprobe | ART- |
| Ellis et al. 2011 | 12 | Stuhlprobe | ART-, ART+ longitudinal: 4 Pat. |
| Lozupone et al. 2013 | 25 | Stuhlabstrich | ART-, ART+ |
| McHardy et al. 2013 | 40 | rektaler Schwamm | ART-, ART+ |
| Perez-Santiago et al. 2013 | 13 | Stuhlabstrich | ART-, ART+ longitudinal |
| Vujkovic-Cvijin et al. 2013 | 25 | Biopsie | ART-, ART+ |
| Dillon et al. 2014 | 18 | Biopsie, Stuhlprobe | ART- |
| Mutlu et al. 2014 | 21 | Biopsie, Stuhlprobe | ART+ |
| Dinh et al. 2015 | 21 | Stuhlprobe | ART+ |
| Nowak et al. 2015 | 31 | Stuhlprobe | ART-, ART+ longitudinal: 19 Pat. |
| Vasquez-Castellanos et al. 2015 | 9 | Stuhlprobe | ART+ |
| Dubourg et al. 2016 | 32 | Stuhlprobe | ART-, ART+ |
| Ling et al. 2016 | 67 | Stuhlprobe | ART-, ART+ |
| Monaco et al. 2016 | 82 | Stuhlprobe | ART-, ART+ |
| Noguera-Julian et al. 2016 | 206 | Stuhlprobe | ART-, ART+ |
| Sun et al. 2016 | 13 | Stuhlprobe | ART-, ART+ |
| Yang et al. 2016 | 8 | Abstrich oral, Cytobrush Ösophagus, Magen, Duodenum | ART- |

1.11.2 Abundanz der Taxa

Die Zusammensetzung des Mikrobioms bei Patienten unter ART konnte sowohl Ähnlichkeit mit HIV-negativen Kontrollen als auch mit unbehandelten HIV-Patienten haben (Lozupone et al. 2013; Vujkovic-Cvijin et al. 2013). Veränderungen lagen

unabhängig von der Dauer der ART auch nach mehreren Jahren unter Therapie vor (Lozupone et al. 2013).

Innerhalb des Phylum Bacteroidetes wurde bei HIV-Patienten mehrfach ein verminderter Anteil der Gattung *Bacteroides* und eine Vermehrung der Gattung *Prevotella* gefunden (Lozupone et al. 2013; Dillon et al. 2014; Mutlu et al. 2014; Vazquez-Castellanos et al. 2015; Ling et al. 2016). In der Folge wurde jedoch gezeigt, dass bei MSM unabhängig vom HIV-Serostatus häufiger einen hoher Anteil *Prevotella* vorliegt und bei nicht-MSM ein höherer Anteil *Bacteroides* (Noguera-Julian et al. 2016).

Des Weiteren war bei HIV-Patienten die Gattung *Alistipes* reduziert (Lozupone et al. 2013; McHardy et al. 2013; Vujkovic-Cvijin et al. 2013; Dillon et al. 2014; Dinh et al. 2015). Die Abnahme dieser Gattung ist auch bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen bekannt (Frank et al. 2007).

Bakterien des Phylum Proteobacteria wurden bei HIV Patienten vermehrt nachgewiesen. Hierbei handelte es sich vor allem um die Ordnung Enterobacteriales bzw. die Familie Enterobacteriaceae (Ellis et al. 2011; Vujkovic-Cvijin et al. 2013; Mutlu et al. 2014; Sun et al. 2016; Dinh et al. 2015), aber auch die Gattungen *Succinivibrio* (Vazquez-Castellanos et al. 2015) und *Desulfovibrio* (Lozupone et al. 2013).

Bei Betrachtung des Phylum Firmicutes zeigte sich bei HIV Patienten ein reduziertes Vorkommen der Klasse Clostridia und Ordnung Clostridiales (Vujkovic-Cvijin et al. 2013). Hier waren in der Familie Lachnospiraceae die Gattungen *Coprococcus*, *Blautia* und *Roseburia* vermindert sowie die Gattung *Ruminococcus* der Familie Ruminococcaceae (McHardy et al. 2013; Dillon et al. 2014; Mutlu et al. 2014; Vazquez-Castellanos et al. 2015; Dubourg et al. 2016; Ling et al. 2016). In einer anderen Studie war hingegen die Abundanz der Ruminococcaceae vermehrt (Lozupone et al. 2013).

Innerhalb der Clostridiales war bei HIV-Patienten *Faecalibacterium prausnitzii* in mehreren Studien vermindert (Mutlu et al. 2014; Nowak et al. 2015; Vazquez-Castellanos et al. 2015; Dubourg et al. 2016). Nur in einer Studie war der Anteil des Bakteriums signifikant erhöht (Ling et al. 2016). Die antiinflammatorische Wirkung von *Faecalibacterium prausnitzii* durch die Produktion von Butyrat wurde unter anderem im Zusammenhang mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen untersucht. Auch bei Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa war in Studien ein verminderter Anteil

von *Faecalibacterium prausnitzii* gefunden worden (Sokol et al. 2009; Lopez-Siles et al. 2016).

Eine Studie fand eine Zunahme aerotoleranter Bakterien wie *Enterococcus*, während obligat anaerobe Gattungen wie *Faecalibacterium* und *Ruminococcus* sowie *Bifidobacterium* reduziert waren (Dubourg et al. 2016). Eine Verminderung von *Bifidobacterium* und *Lactobacilli* in der frühen Phase der HIV-Infektion war bereits in einer der ersten Mikrobiomstudien bei HIV-Patienten nachgewiesen worden (Gori et al. 2008). Im Gegensatz dazu war der Anteil der Gattung *Lactobacillus* jedoch in einer späteren Studie bei unbehandelten HIV-Patienten erhöht (Nowak et al. 2015).

1.11.3 Zusammenhang mit der CD4-Zellzahl

In einzelnen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen der Häufigkeit einzelner Taxa und dem Verlust (Ellis et al. 2011) oder der Aktivierung von CD4-Zellen in der Darmmukosa (Vujkovic-Cvijin et al. 2013; Dillon et al. 2014) hergestellt. Mit der CD4-Zellzahl im Blut korrelierten die Häufigkeiten bestimmter Taxa in zwei Studien (Pérez-Santiago et al. 2013; Monaco et al. 2016). In einzelnen Studien wurde zwischen der α -Diversität und der CD4-Zellzahl im Blut zu bestimmten Zeitpunkten ein Zusammenhang beschrieben (Nowak et al. 2015; Noguera-Julian et al. 2016; Monaco et al. 2016).

2 Ziel der Arbeit

Bei Menschen mit HIV wurden in verschiedenen Studien Veränderungen der Darmmikrobiota nachgewiesen. Die meisten dieser Studien wurden als Querschnittstudien durchgeführt, welche das Mikrobiom HIV-positiver Patienten mit dem HIV-negativer Kontrollen verglichen. Die Ergebnisse in Bezug auf die Veränderungen des Mikrobioms unterschieden sich dabei deutlich zwischen den Studien. Dies betraf sowohl die Diversität als auch die Abundanz einzelner Taxa.

Daraus ergab sich die Frage, ob klinische Faktoren das Mikrobiom bei HIV-Patienten beeinflussen und ob sich das Mikrobiom nach Beginn der ART verändert. Die vorliegende Längsschnittstudie untersuchte das Mikrobiom einer Kohorte sowohl vor als auch nach ART-Beginn. Zudem wurden die klinischen Daten jedes Patienten analysiert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war

- die Beschreibung der klinischen Merkmale der HIV-positiven Patienten während der neunmonatigen Studiendauer.
- die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen dem Darmmikrobiom und möglichen Einflussfaktoren wie Antibiotika, ART und CD4-Zellzahl.
- die Beurteilung des Darmmikrobioms im Zeitverlauf vor und nach ART-Beginn.

3 Material und Methoden

3.1 Studienplanung

3.1.1 Studienprotokoll

Das Studienprotokoll wurde unter Berücksichtigung der Leitlinien der Guten Klinischen Praxis (GCP) erstellt. Demnach wurden die Risiken und Unannehmlichkeiten für den Patienten gegen den zu erwartenden Nutzen abgewogen. Das Protokoll wurde der Ethikkommission der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München vorgelegt und in der Sitzung vom 25.03.2014 beraten und genehmigt.

3.1.2 Patienteninformation und Patienteneinwilligung

Um die Patienten über den Ablauf und die Ziele der Studie aufzuklären, wurde eine Patienteninformation verfasst und zusammen mit dem Studienprotokoll und der Eiverständniserklärung bei der Ethikkommission eingereicht. Sie enthält des Weiteren Informationen zum Datenschutz und zum Umgang mit den Proben der Patienten (siehe Anhang).

3.1.3 Aufwandsentschädigung

Die Patienten erhielten für jeden Termin im Rahmen der Studie eine Aufwandsentschädigung in Höhe von 20,00 Euro. Hatten die Patienten alle vier Termine wahrgenommen, erhielten sie demnach eine Aufwandsentschädigung von 80,00 Euro. Diese wurde ihnen nach Abschluss der Studie auf ihr Konto überwiesen.

3.2 Studienpopulation

3.2.1 Fallzahl und Rekrutierung

Die vorliegende Studie sollte als Pilotstudie untersuchen, ob sich das Mikrobiom im Verlauf der ART verändert und damit als Grundlage für weiterführende Studien dienen.

Dafür wurde eine Fallzahl von 20 Patienten festgelegt. Die Rekrutierung der Studienteilnehmer erfolgte ausschließlich im Prüfzentrum, dem Interdisziplinären HIV-Zentrum am Klinikum rechts der Isar (IZAR).

3.2.2 Einschluss- und Ausschlusskriterien

Folgende Einschlusskriterien mussten für die Studienteilnahme erfüllt sein:

- Alter über 18 Jahre
- HIV-positiv
- Aufklärung des Patienten durch einen Prüfarzt
- Schriftliche Einverständniserklärung

Hauptausschlusskriterium war eine bereits eingeleitete ART. Darüber hinaus wurde gefordert, dass die Wiedervorstellung zu den Folgeterminen im IZAR möglich ist.

3.3 Datenschutz

Bei der Rekrutierung wurde jedem Patienten eine fortlaufende Nummer zugeordnet. Alle Proben wurden pseudonymisiert mit der Patientennummer und dem Entnahmedatum beschriftet. Die klinischen Daten der Patienten wurden ebenfalls pseudonymisiert dokumentiert. Die unterschriebenen Einverständniserklärungen sowie die Patientenliste werden in einem öffentlich nicht zugänglichen Raum in der Klinik für Dermatologie am Biederstein aufbewahrt.

3.4 Studienablauf

Die Abgabe der Stuhlproben erfolgte zu den regulären Behandlungsterminen im IZAR. Anamnese, körperliche Untersuchung und Laboruntersuchungen wurden zu diesen Terminen im Rahmen der regulären Behandlung durchgeführt. Das Screening beinhaltete die ausführliche Aufklärung der Patienten über die Ziele der Studie. Der Ablauf der Studie ist in Abbildung 4 dargestellt. Nach erfolgtem Screening wurde die erste Stuhlprobe vor Beginn der ART abgegeben (Zeitpunkt 0). Die weiteren Proben folgten 3,

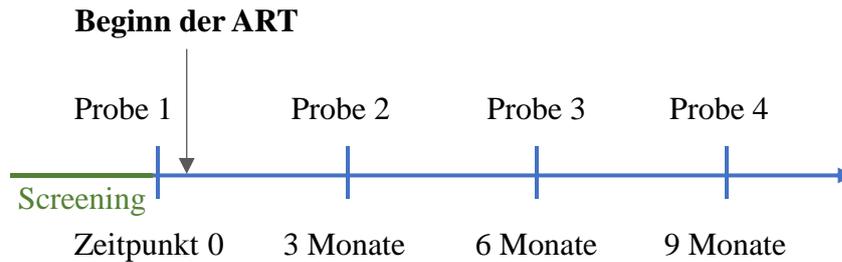


Abbildung 4: zeitlicher Ablauf der Studie

6 und 9 Monate nach ART-Beginn. Dazu wurde den Patienten jeweils vor dem Folgetermin ein Probenröhrchen per Post zugeschickt. Die Termine werden entsprechend den abgegebenen Proben in der Folge als Visit 1, 2, 3 und 4 bezeichnet.

3.5 Datenerhebung

Um die Rekonstitution des Immunsystems zu beurteilen und Einflussfaktoren auf das Mikrobiom zu identifizieren, wurden die im Rahmen der regulären Untersuchung erhobenen Daten erfasst. Das Immunsystem wurde anhand der CD4-Zellzahl im Blut beurteilt. Für die Einteilung der Werte in die Gruppen niedrig ($< 200/\mu\text{l}$), mittel ($200-499/\mu\text{l}$) und hoch ($\geq 500/\mu\text{l}$) wurden die Grenzen entsprechend der CDC-Klassifikation gewählt. Die Viruslast im Blut wurde ebenfalls in die Gruppen niedrig (< 5000 Kopien/ml), mittel ($5000-50.000$ Kopien/ml) und hoch (> 50.000 Kopien/ml) eingeteilt. Als mögliche Einflussfaktoren auf das Darmmikrobiom wurden die Gabe von Antibiotika, das ART-Regime, das Auftreten von Diarrhö, Begleiterkrankungen und eingenommene Medikamente dokumentiert.

3.6 Untersuchungsmaterial

Die Stuhlproben wurden von den Patienten selbst am Tag des Untersuchungstermins entnommen. War es einem Patienten nicht möglich, die Probe zum Termin im Prüfzentrum mitzubringen, erhielt er einen vorfrankierten Umschlag, um die Probe per Post an die Klinik zu schicken. Die Proben wurden in einem kliniküblichen Probenröhrchen für Stuhlproben mit Entnahmelöffel aus Kunststoff im Prüfzentrum

abgegeben und ab diesem Zeitpunkt kühl gelagert. Innerhalb weniger Stunden wurden die Proben bei -80 °C eingefroren und so bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

3.7 DNA-Isolierung

Die bakterielle DNA wurde entsprechend dem Protokoll von T. Clavel (Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung, TU München) aus den Stuhlproben isoliert. Es wurde das *NucleoSpin gDNA Clean-up* Kit von Macherey-Nagel verwendet. Zuerst wurde ein Testlauf mit verschiedenen Probenmengen durchgeführt. Da größere Proben zu einer stärkeren Verunreinigung des Eluats bei gleicher DNA-Konzentration führten, wurde eine geringere Probenmenge gewählt. Diese wurde mit Hilfe eines sterilen Skalpell aus dem Probenröhrchen entnommen und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, welches mit 5-8 sterilen Glaskügelchen befüllt war. Nach Hinzugabe von 1 ml DNA-Stabilisierungslösung wurden die Stuhlproben aufgeschlossen. Dazu wurden die Proben im FastPrep-24-Instrument (MP Biomedicals) 20 Sekunden bei 4,0 m/s homogenisiert. Die Proben wurden 10 Minuten auf Eis gestellt, bis sich die festen Bestandteile abgesetzt hatten. Im Anschluss konnte der Überstand (600 µl) in ein 2 ml Reaktionsgefäß pipettiert werden, welches mit 500 mg 0,1 mm Zirkonia-Kügelchen vorbereitet war. Zum Aufschluss der Bakterien wurde mit 20 mg/ml Lysozym für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Hinzugabe von 400 µl Phenol-Chloroform wurden die Proben in drei Durchläufen im FastPrep-24-Instrument bei 6,5 m/s für 40 Sekunden aufgeschlossen. Als nächstes wurden die Proben für 8 Minuten auf 95 °C erhitzt und bei 16.000 rpm und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 0,1 µg/µl RNase für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde entsprechend dem Protokoll des *NucleoSpin gDNA Clean-up* Kits vorgegangen. Dabei wurden die Säulen mit 300 µl der Probe beladen und mit 700 µl gewaschen. Zuletzt wurde mit zweimal 50 µl Elutionspuffer eluiert. Zuletzt wurden der DNA-Gehalt und die DNA-Qualität mit einem Spektralphotometer (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific) gemessen. Dabei wurden die DNA-Konzentration und die Reinheit bestimmt.

3.8 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung und die Sequenzanalyse wurden am Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung der TU München durchgeführt. Die Methode zur Analyse des Darmmikrobioms war die gezielte Amplikon-Sequenzierung des 16S-rRNA Gens. Zur Erstellung der Amplikon-Library wurde die V3/V4-Region der 16S-rRNA-Gene durch PCR amplifiziert. Dies erfolgte in 25 Zyklen entsprechend einem zweistufigen Protokoll (Berry et al. 2011) unter Verwendung der bakterienspezifischen Primer 341F-785R (Klindworth et al. 2013). Die Amplikons wurden mit dem AMPure XP-System (Beckmann) gereinigt. Im Anschluss erfolgte die Sequenzierung der gepoolten Proben im Paired-End-Modus mit einem MiSeq-System (Illumina) und einer 25 % (v/v) PhiX Standard-Library.

3.9 Sequenzanalyse

Die Analyse der Rohdaten der Sequenzierung erfolgte durch IMNGS (Lagkouravdos et al. 2016), einer UPARSE-basierten Pipeline (Edgar 2013). Als Demultiplexer wurde ein unveröffentlichtes Perl-Skript (demultiplexor_v3.pl) eingesetzt. Das Pairing und die Qualitätsfilterung erfolgten mit USEARCH7 (Edgar 2010). Mittels UCHIME (Edgar et al. 2011) wurden Chimäre detektiert und entfernt. Bei der Bildung der Operativen Taxonomischen Einheiten (OTUs) durch USEARCH7 wurde eine Ähnlichkeit der Sequenzen von > 97 % für die Einordnung in die gleiche OTU festgelegt. Alle OTUs, deren Anteil bei > 0,25 % lag, wurden herausgefiltert und weiter berücksichtigt.

Der Sequenzabgleich erfolgte mit MUSCLE (Edgar 2004) im Programm MEGA6. Zur taxonomischen Klassifikation wurde die Referenzdatenbank des Ribosomal Database Project (RDP) mit dem RDP classifier Version 2.10 training set 10 (Wang et al. 2007) verwendet. Mit dem Programm Fast Tree wurde ein phylogenetischer Baum erstellt (Price et al. 2010).

3.10 Statistische Analyse

Die weitere Auswertung der OTU-Tabelle und die statistische Analyse erfolgten in Microsoft Office Excel 2016 und in RStudio (RStudio Inc., Boston, Massachusetts, USA) unter Verwendung der Rhea-Skripte (Lagkouravdos et al. 2017). Der OTU-Datensatz wurde normalisiert, um die unterschiedlich häufige Sequenzierung der verschiedenen Proben auszugleichen und relative Häufigkeiten der einzelnen Taxa zu erhalten. Zur Charakterisierung der Bakterienvielfalt wurde die α -Diversität durch Artenvielfalt (*richness*), Shannon-Index und Simpson-Index quantifiziert. Der Shannon- und der Simpson-Index wurden in die effektive Artenzahl umgerechnet, welche sich im Gegensatz zu den Indices linear verhält (Jost 2007).

Die β -Diversität wurde mittels generalisierter UniFrac-Distanzen berechnet (Chen et al. 2012). Die Daten wurden mit Hilfe von multidimensionaler Skalierung (MDS) bzw. nicht-metrische multidimensionale Skalierung (NMDS) grafisch dargestellt.

Um zu testen, ob die erhobenen klinischen Daten wie Viruslast, CD4-Zellzahl in Blut oder Antibiotikatherapie die Diversität des Mikrobioms oder die Häufigkeit einzelner Taxa beeinflussen, wurde eine Varianzanalyse durchgeführt. Für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde der parameterfreie Kruskal-Wallis-Test angewandt. Im Anschluss, oder bei Vorliegen von zwei Gruppen, wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test paarweise getestet. Die p-Werte wurden nach der Benjamini-Hochberg-Methode für Mehrfachvergleiche angepasst.

Anschließend wurden die Ergebnisse in Boxplot-Diagrammen dargestellt. Diese bilden den Median sowie das obere und untere Quartil und damit den Interquartilsabstand ab. Die Antennen entsprechen den Werten innerhalb des 1,5-Fachen des Interquartilsabstands. Werte außerhalb dieses Bereichs werden als Ausreißer betrachtet und sind als Punkte dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Patientenkollektiv

4.1.1 Alters- und Geschlechterverteilung

In einem Zeitraum von 7 Monaten wurden 15 Studienteilnehmer rekrutiert. Zwei der Teilnehmer schieden aus der Studie aus, ohne eine Stuhlprobe abgegeben zu haben. Von den verbliebenen 13 Teilnehmern waren 12 männlich und eine weiblich im Alter zwischen 21 und 51 Jahren. Der Altersdurchschnitt bei Studieneinschluss betrug $36,5 \pm 8,4$ Jahre (Tabelle 4).

4.1.2 Vorangegangene HIV-Therapie

Zwei der Patienten hatten in der Vergangenheit bereits eine ART erhalten. Diese war in einem der Fälle seit sechs Jahren nicht mehr eingenommen worden, im anderen Fall vier Wochen vor Studieneinschluss nach einmonatiger Einnahme selbstständig abgebrochen worden. Beide Patienten präsentierten sich beim Screening mit niedriger CD4-Zellzahl und hoher Viruslast. Aus diesem Grund wurden beide Patienten in die Studie eingeschlossen.

4.1.3 Begleiterkrankungen

Bei Studieneinschluss bestand bei einem Patienten eine Hepatitis B-Koinfektion. Ein weiterer Patient litt zu Studienbeginn unter einer blutigen Kolitis mit Verdacht auf Colitis ulcerosa. Bei 6 Patienten wurde in der Zeit zwischen Screening und Abschluss der Studie eine Lues-Infektion diagnostiziert.

4.1.4 CDC-Stadium

Das Stadium der HIV-Infektion wurde nach der CDC-Klassifikation eingeteilt. Wie in Tabelle 3 dargestellt, erfüllten zum Zeitpunkt des Screenings 8 Patienten die Kriterien für Stadium A. Die weiteren 5 Patienten befanden sich im Stadium C.

Tabelle 3: CDC-Stadium der Studienpatienten

| CDC-Stadium | A1 | A2 | A3 | B | C1 | C2 | C3 |
|----------------------|----|----|----|---|----|----|----|
| Patientenzahl | 4 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 5 |

4.1.5 Viruslast und CD4-Zellzahl

Die Viruslast lag bei allen Patienten zum Zeitpunkt 0 im mittleren oder hohen Bereich und war nach 9 Monaten unter die Nachweisgrenze von 50 Kopien/ml abgesunken. Bei Betrachtung der CD4-Zellzahl zeigten sich sowohl zu Beginn als auch am Ende der Studie erhebliche Unterschiede zwischen den einzelnen Patienten (Tabelle 4).

Tabelle 4: Übersicht über Alter, Viruslast und CD4-Zellzahl der Studienteilnehmer

| | Mittelwert | ± Standard- abweichung | Minimum | Maximum |
|--|----------------------|---------------------------|---------|-----------|
| Patientenalter (Jahre) | 36,5 | ± 8,4 | 21 | 51 |
| Viruslast Kopien/ml Zeitpunkt 0 | 274.120 | ± 464.334 | 8.560 | 1.470.000 |
| Viruslast Kopien/ml 9 Monate | nicht nachweisbar | - | - | - |
| CD4/µl Zeitpunkt 0 | 355 | ± 343 | 10 | 1610 |
| CD4/µl 9 Monate | 616 | ± 630 | 10 | 2280 |

Tabelle 5: CD4-Zellzahl zum Zeitpunkt 0

| CD4-Zellzahl Zeitpunkt 0 | niedrig < 200/µl | mittel 200-499/µl | hoch ≥ 500/µl |
|-----------------------------|---------------------|----------------------|------------------|
| Patientenzahl | 5 | 5 | 3 |

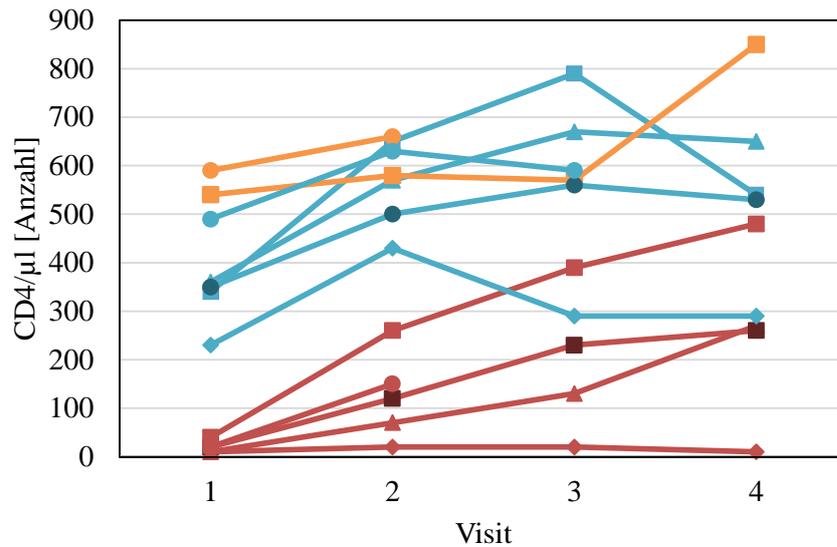


Abbildung 5: CD4-Zellzahl der einzelnen Patienten im Studienverlauf, ausgenommen Patient 5

Wie in Tabelle 5 dargestellt, lag zum Zeitpunkt 0 bei 5 Patienten eine niedrige CD4-Zellzahl von $< 200/\mu\text{l}$ vor. Bei weiteren 5 Patienten lagen die Werte im mittleren Bereich ($200\text{-}499/\mu\text{l}$). Drei Patienten hatten zum Zeitpunkt 0 eine hohe CD4-Zellzahl von $\geq 500/\mu\text{l}$.

In Abbildung 5 ist der Verlauf der CD4-Zellzahl der einzelnen Patienten über die gesamte Studiendauer dargestellt. Mit Ausnahme eines Patienten stieg bei Patienten mit niedriger CD4-Zellzahl zum Zeitpunkt 0 der Wert innerhalb von 9 Monaten in den mittleren Bereich (rote Linien). Bei Patienten mit einer mittleren CD4-Zellzahl zum Zeitpunkt 0 lag diese mit einer Ausnahme nach 9 Monaten im hohen Bereich (blaue Linien). Die initial hohe CD4-Zellzahl bei drei Patienten blieb während der gesamten Studie im hoch (orange Linien). Nicht abgebildet ist die CD4-Zellzahl von Patient 5, die im Verlauf der Studie von initial $1610/\mu\text{l}$ auf $2280/\mu\text{l}$ anstieg.

4.1.6 Antiretrovirale Therapie

Einen Überblick über die antiretroviralen Substanzen, mit denen die ART bei den Studienteilnehmern eingeleitet wurde, gibt Tabelle 6. Bei 10 von 13 Patienten erfolgte die Initialtherapie mit zwei NRTI in Kombination mit einem geboosterten PI. Dabei wurden drei verschiedene Kombinationen eingesetzt, wobei alle Patienten Ritonavir (RTV, Norvir) als Booster erhielten. Am häufigsten war die Kombination aus

Truvada/Prezista, gefolgt von Truvada/Reyataz. Ein Patient erhielt Kivexa/Prezista. Die drei weiteren Patienten erhielten zur Initialtherapie zwei NRTI und einen INI. Es wurden die Kombinationen Truvada/Tivicay und Kivexa/Tivicay eingesetzt.

Im Verlauf der Studie wurde bei insgesamt 6 von 13 Patienten das ART-Regime umgestellt. In Tabelle 7 ist dargestellt, welche Medikamente nach dem Wechsel eingenommen wurden. Zwei Patienten wechselten nach 5 Monaten von Truvada/Prezista bzw. nach 8 Monaten von Truvada/Reyataz zu Eviplera. Ein Patient wechselte nach 6 Monaten von Kivexa/Prezista zu Truvada/Prezista. Bei zwei Patienten wurde die Therapie nach einem Monat bzw. nach 5 Monaten von Truvada/Tivicay auf Kivexa/Tivicay bzw. Triumeq umgestellt. Ein weiterer Patient wechselte nach 3 Monaten von Kivexa/Tivicay zu Truvada/ Prezista und nach 6 Monaten zu Triumeq.

Tabelle 6: antiretrovirale Substanzen bei Therapie-Induktion

| Substanzklasse | Wirkstoff | Handelsname | Anzahl |
|-----------------------|-------------------|---------------------------|---------------|
| NRTI + PI/r | TDF/FTC, DRV, RTV | Truvada, Prezista, Norvir | 6 Patienten |
| NRTI + PI/r | TDF/FTC, ATV, RTV | Truvada, Reyataz, Norvir | 3 Patienten |
| NRTI + PI/r | ABC/3TC, DRV, RTV | Kivexa, Prezista, Norvir | 1 Patient |
| NRTI + INI | TDF/FTC, DTG | Truvada, Tivicay | 2 Patienten |
| NRTI + INI | ABC/3TC, DTG | Kivexa, Tivicay | 1 Patient |

Tabelle 7: antiretrovirale Substanzen im Studienverlauf

| Substanzklasse | Wirkstoff | Handelsname | Anzahl |
|-----------------------|-------------------|---------------------------|---------------|
| NRTI + NNRTI | TDF/FTC/RLP | Eviplera | 2 Patienten |
| NRTI + PI/r | TDF/FTC, DRV, RTV | Truvada, Prezista, Norvir | 1 Patient |
| NRTI + INI | ABC/3TC, DTG | Kivexa, Tivicay | 1 Patient |
| NRTI + INI | ABC/3TC/DTG | Triumeq | 2 Patienten |

4.1.7 Antibiotikatherapie

Die Mehrzahl der Patienten erhielt im Zeitraum zwischen dem Screening und der Abgabe der letzten Stuhlprobe eine orale, intravenöse (i.v.) oder intramuskuläre Antibiotikatherapie. Wie in Tabelle 8 dargestellt, erhielten von 13 Patienten insgesamt 10 Patienten Antibiotika, davon 9 zur Therapie einer akuten Infektion. Ein Patient nahm ausschließlich Cotrimoxazol zur Prophylaxe einer PCP ein.

Tabelle 8: Häufigkeit und Art der Antibiotikatherapie während der Studie

| | |
|--|--------------------------------------|
| Antibiotikatherapie allgemein | 10 Patienten |
| ausschließlich Cotrimoxazol-Prophylaxe | 1 Patient oral |
| Penicillin | 4 Patienten: 2 i.v., 2 intramuskulär |
| Cotrimoxazol | 2 Patienten i.v. |
| Ceftriaxon, Azithromycin, Metronidazol | 1 Patient i.v. und oral |
| Ceftriaxon | 1 Patient i.v. |
| Moxifloxacin | 1 Patient i.v. |

4.2 Stuhlproben

4.2.1 Probenanzahl

Von 13 Patienten konnten in einem Zeitraum von 13 Monaten insgesamt 37 Stuhlproben gewonnen werden. Bei den zwei zuletzt rekrutierten Patienten war bei Abschluss der Studie der Zeitpunkt der letzten Probenabgabe (9 Monate) noch nicht erreicht. Aus verschiedenen Gründen war es nicht möglich, eine höhere Probenzahl zu erreichen. Dazu gehörte die Zuverlässigkeit der Patienten in Bezug auf das Wahrnehmen der Untersuchungstermine. Außerdem war es den Patienten nicht immer möglich, am Tag der Untersuchung eine Stuhlprobe abzugeben.

4.2.2 Qualität nach DNA-Isolierung

Nach der Isolierung der DNA aus den Stuhlproben wurden die DNA-Konzentration und deren Qualität spektralphotometrisch (NanoDrop) gemessen. Die DNA-Konzentration aller 37 Proben lag im Durchschnitt bei 99,2 ng/ μ l (\pm 68,6 ng/ μ l). Bei insgesamt fünf

Proben mit niedrigem DNA-Gehalt wurde die Isolation wiederholt. So konnten 35 von 37 Proben erfolgreich sequenziert werden. In zwei Proben war der DNA-Gehalt zu niedrig für die Sequenzierung. Die Konzentrationen lagen hier nach wiederholter Isolierung bei 7,3 ng/ μ l und 14,7 ng/ μ l.

4.2.3 Qualität der Sequenzierung

Die in der Sequenzierung gelesenen DNA-Abschnitte werden im Englischen als *reads* bezeichnet. Die durchschnittliche Anzahl der *reads* pro Probe betrug 9779 ± 2278 . In Abbildung 6 ist die Anzahl der *reads* und die Anzahl der detektierten OTUs für jede der einzelnen Proben dargestellt. Die Verteilung der Proben zeigt, dass die Anzahl der gefundenen OTUs nicht von der Anzahl der *reads* abhängig war. Dieses Ergebnis spricht für eine ausreichende Tiefe der Sequenzierung.

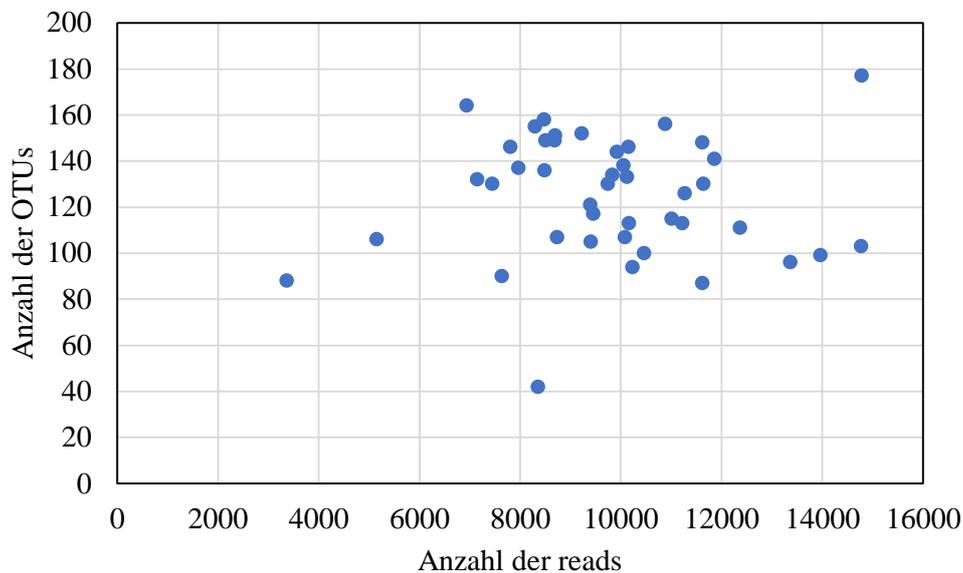


Abbildung 6: Darstellung der Anzahl der reads und der Anzahl der detektierten OTUs für alle Proben

4.3 Interindividuelle Unterschiede des Mikrobioms

Im Rahmen der Mikrobiomanalyse wurde zunächst die Ähnlichkeit aller Proben mittels MDS untersucht. Abbildung 7 zeigt die β -Diversität aller Stuhlproben. Dabei sind die Proben nach Patienten gruppiert und jeweils in gleicher Farbe dargestellt. In dieser Darstellung zeigt sich die Ähnlichkeit zwischen Proben der gleichen Person. Die Trennung der einzelnen Gruppen war signifikant ($p = 0,001$). Die größte Streuung zeigten die Proben eines Patienten mit dreifacher Antibiotikatherapie (Patient 7).

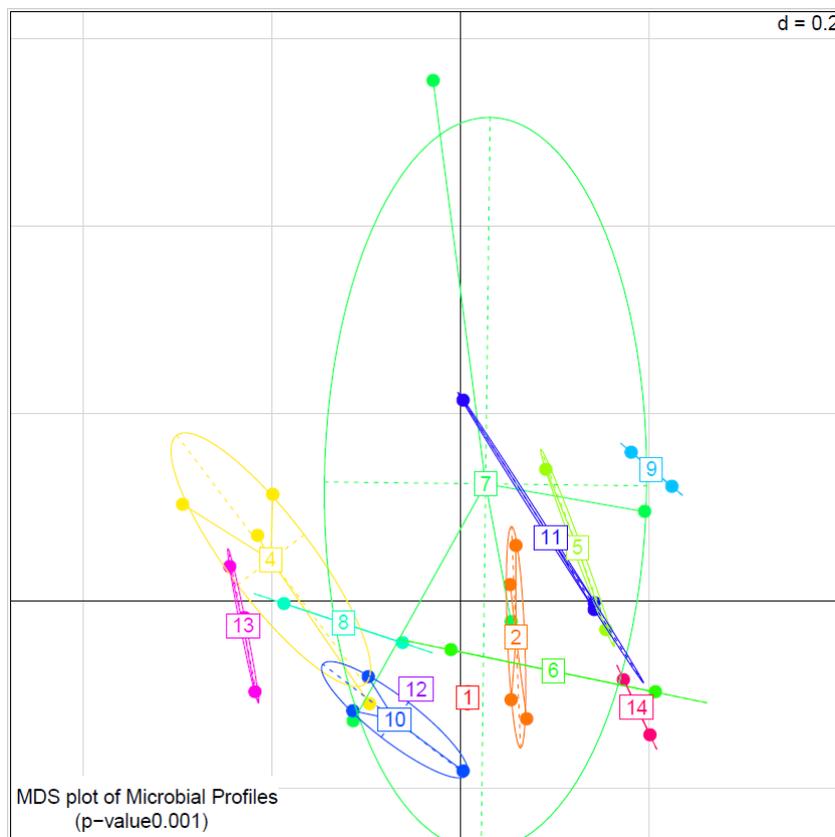


Abbildung 7: β -Diversität aller Proben im MDS-Plot; die Proben wurden nach Patienten gruppiert

4.4 Einfluss der ART auf das Mikrobiom

In diesem Abschnitt werden die Proben in Abhängigkeit des zeitlichen Abstands zum ART-Beginn betrachtet, um Veränderungen des Mikrobioms im Verlauf der ART zu beurteilen.

4.4.1 α -Diversität

Die Artenvielfalt lag im Durchschnitt aller Proben bei $107 (\pm 26)$. Wie Abbildung 8 zeigt, war der Median der Artenvielfalt bei Visit 2 nach 3 Monaten mit 105 niedriger als bei Visit 1 vor ART-Beginn (Median 118). Die Stichprobe Visit 2 beinhaltet eine Stuhlprobe (Probe 17) nach dreifacher Antibiotikatherapie, welche 11 Tage vor Abgabe der Probe begonnen worden war. In dieser Probe lag die Artenvielfalt bei nur 27. Insgesamt bestand kein signifikanter Unterschied der Artenvielfalt zu den verschiedenen Zeitpunkten ($p = 0,89$).

Die effektive Artenzahl (Shannon) betrug im Durchschnitt aller Proben $37,4 (\pm 13,6)$. Wie die Artenvielfalt war auch die effektive Artenzahl bei Visit 2 mit einem Median von 30 niedriger als vor ART-Beginn (Median 38). Dies ist in Abbildung 9 dargestellt. Diese Stichprobe beinhaltet wiederum Probe 17 nach dreifacher antibiotischer Therapie mit einer effektiven Artenzahl von 4,7. Insgesamt war der Unterschied der effektiven Artenzahl (Shannon) zu den verschiedenen Zeitpunkten der Studie nicht signifikant ($p = 0,47$).

Bei der Einteilung in Proben unter ART und ohne ART wurde kein Einfluss des ART-Status auf Artenvielfalt ($p = 0,69$) und effektive Artenzahl (Shannon) ($p = 0,40$) nachgewiesen. Da Antibiotika einen möglichen Störfaktor bei der durchgeführten Analyse darstellen, wurden außerdem die Proben von 4 Patienten untersucht, vor deren Abgabe kein Antibiotikum oder ausschließlich Cotrimoxazol verabreicht wurde. Der

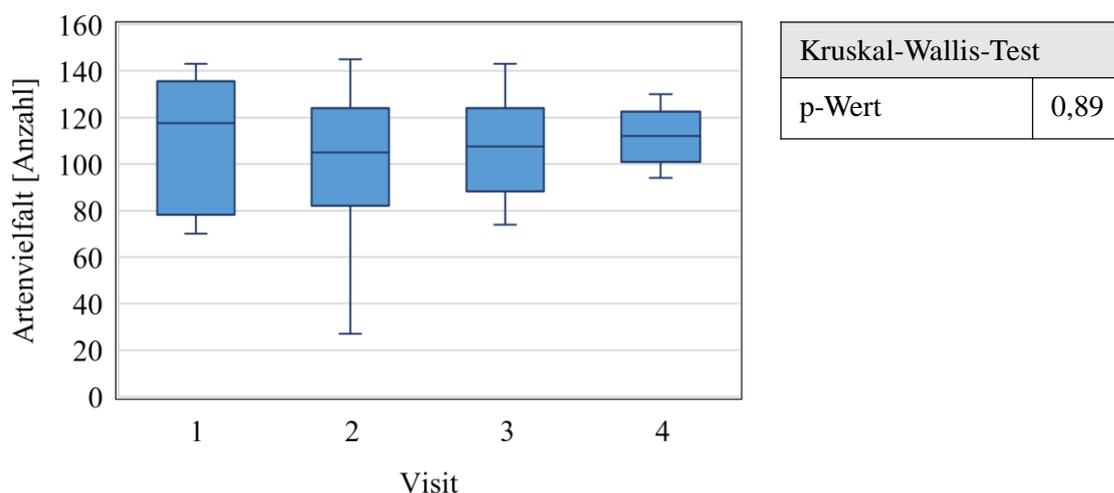


Abbildung 8: Darstellung der α -Diversität mittels Artenvielfalt (richness); Abbildung aller Proben vor ART-Beginn (Visit 1) sowie nach 3, 6 und 9 Monaten (Visit 2, 3 und 4)

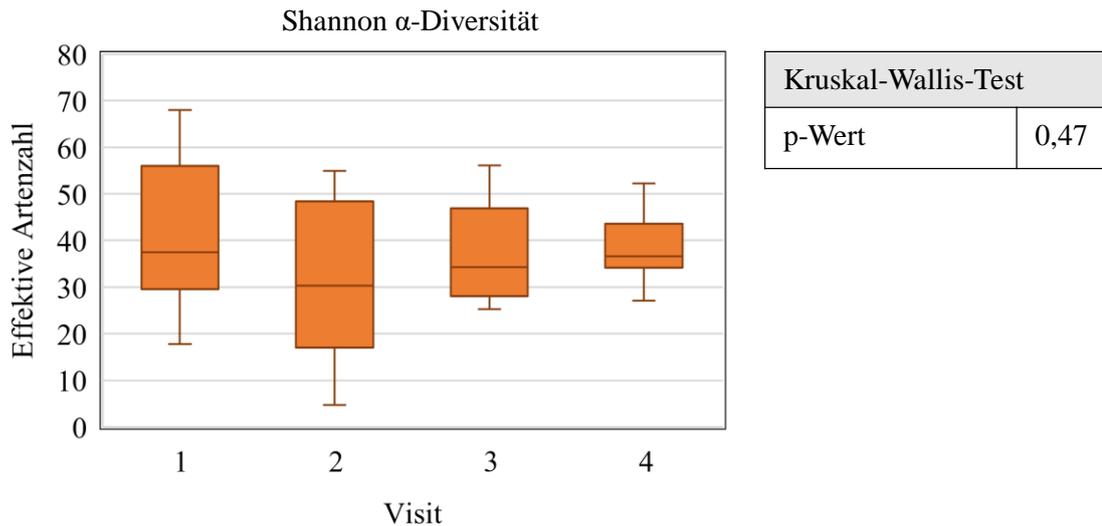


Abbildung 9: Darstellung der α -Diversität mittels effektiver Artenzahl berechnet aus dem Shannon-Index; Abbildung aller Proben vor ART-Beginn (Visit 1) sowie nach 3, 6 und 9 Monaten (Visit 2, 3 und 4)

Vergleich dieser Proben vor ART und nach ART-Beginn zeigte keinen signifikanten Unterschied der Artenvielfalt ($p = 0,25$) und der effektiven Artenzahl (Shannon) ($p = 0,25$).

4.4.2 β -Diversität

In Kapitel 4.3 (S. 33) waren die interindividuellen Unterschiede des Mikrobioms anhand der β -Diversität dargestellt worden. Um zu untersuchen, ob diese Unterschiede auch nach Beginn der ART erhalten blieben, wurden die Proben von 4 Patienten ohne Antibiotikatherapie oder nach Gabe von Cotrimoxazol betrachtet. Wie Abbildung 10 zeigt, war die Ähnlichkeit der Proben nach 6-9 Monaten größer als vor ART-Beginn. Das Ergebnis deutet darauf hin, dass die ART das Darmmikrobiom beeinflusst. Beim Vergleich aller Proben vor ART mit den Proben unter ART und bei Einteilung entsprechend der Visits zeigte sich kein Unterschied zwischen den Gruppen.

4.4.3 Häufigkeit der Taxa im Verlauf der ART

Darüber hinaus wurde getestet, ob sich die Häufigkeit einzelner Taxa im Verlauf der ART veränderte. Es konnten weder auf OTU-Ebene noch auf Ebene der Gattung oder Familie signifikante Veränderungen festgestellt werden.

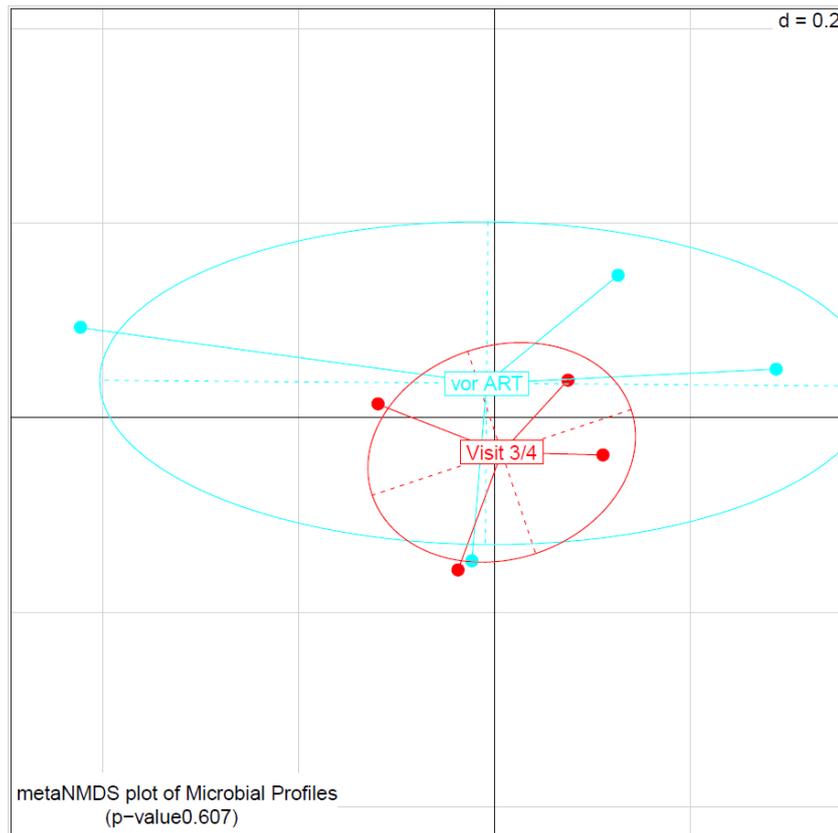


Abbildung 10: β -Diversität der Proben von Patienten ohne Antibiotikatherapie im NMDS-Plot

4.4.4 Häufigkeit der Taxa in Abhängigkeit des ART-Regimes

Wie in Kapitel 4.1.6 (S. 29) beschrieben, wurden im Verlauf der Studie bei 13 Patienten insgesamt 6 ART-Kombinationen eingesetzt. Dabei waren aus der Gruppe der NRTI entweder TDF/FTC oder ABC/3TC Bestandteil jeder dieser Kombinationen. Zwischen Proben mit und ohne ART bestand kein signifikanter Unterschied der Häufigkeit einzelner Familien oder Gattungen des Mikrobioms. Im Folgenden soll untersucht werden, ob sich in Abhängigkeit der verschiedenen ART-Kombinationen Unterschiede in der Zusammensetzung des Mikrobioms feststellen lassen. Wie Abbildung 11 zeigt, unterschied sich die Häufigkeit der Familie Ruminococcaceae signifikant zwischen den Gruppen mit TDF/FTC, ABC/3TC und ohne ART ($p = 0,001$, angepasster p-Wert = 0,028). In Proben, vor deren Abgabe die Patienten ABC/3TC eingenommen hatten, war die Familie Ruminococcaceae häufiger als nach Einnahme von TDF/FTC ($p = 0,001$, angepasster p-Wert = 0,003). In Proben ohne ART lag die Häufigkeit zwischen diesen beiden Gruppen. Es wurde kein Einfluss der gleichzeitig

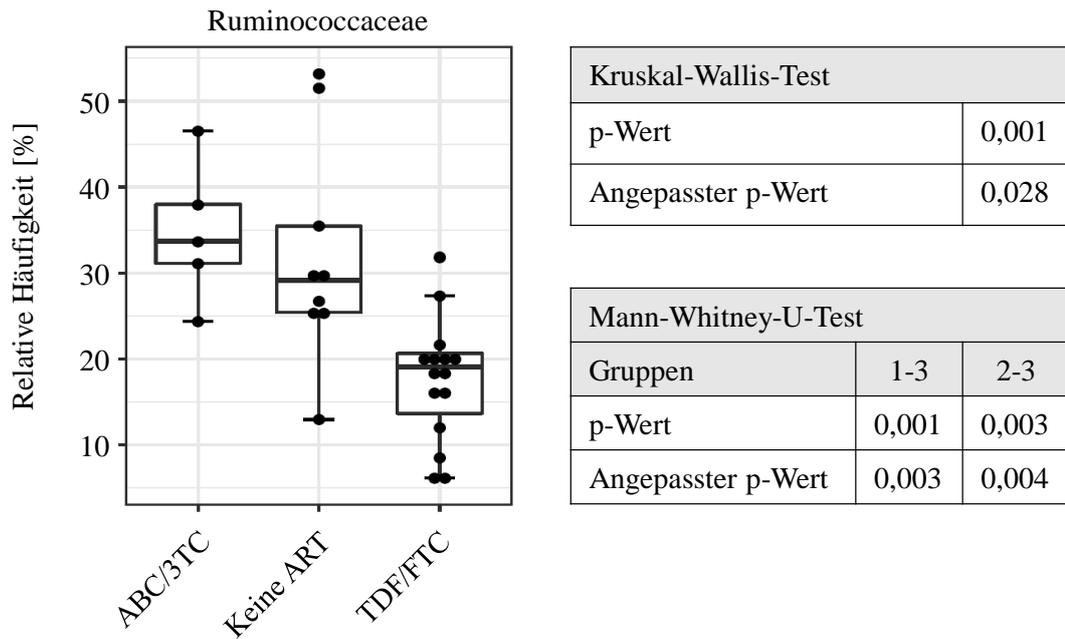


Abbildung 11: Häufigkeit der Familie Ruminococcaceae nach Einnahme verschiedener NRTI; die Proben der Patienten nach Ceftriaxon und dreifacher Antibiotikatherapie wurden nicht berücksichtigt

eingenommenen PI, INI und NNRTI auf die Häufigkeit der Ruminococcaceae oder anderer Familien nachgewiesen.

4.4.5 Wechsel des ART-Regimes

Bei insgesamt 6 von 13 Patienten wurde im Verlauf der Studie das ART-Regime umgestellt. Es wurde kein unmittelbarer Einfluss des ART-Wechsels auf die effektive Artenzahl (Shannon) festgestellt. Ob sich die Therapieumstellung auf die Häufigkeit einzelner Taxa auswirkte ist insofern schwer zu beurteilen, als 5 der 6 Patienten im Studienverlauf eine antibiotische Therapie erhielten. Bei dem verbleibenden Patienten ohne antibiotische Therapie wurde nach Wechsel der ART keine signifikante Veränderung der relativen Häufigkeit einzelner Familien oder Gattungen beobachtet.

4.5 Zusammenhang des Mikrobioms mit der CD4-Zellzahl

Sowohl vor ART-Beginn als auch im Studienverlauf wurde kein Zusammenhang der CD4-Zellzahl mit der Häufigkeit einzelner Gattungen, Familien oder Phylae

nachgewiesen. Darüber hinaus wurde der Einfluss der CD4-Zellzahl auf die α -Diversität untersucht. Die Proben nach Ceftriaxon und dreifacher Antibiotikatherapie wurden dabei nicht miteinbezogen. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den Gruppen mit niedriger, mittlerer und hoher CD4-Zellzahl vor ART-Beginn (Artenvielfalt: $p = 0,45$ Shannon: $p = 0,29$). Auch bei Betrachtung des gesamten Studienverlaufs unterschieden sich Artenvielfalt ($p = 0,42$) und effektive Artenzahl (Shannon) ($p = 0,26$) nicht signifikant zwischen den Gruppen. Der Vergleich jeweils einer Probe vor und nach ART-Beginn der 4 Patienten ohne Antibiotikagabe oder mit Cotrimoxazol zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied der Artenvielfalt ($p = 0,41$) oder der effektiven Artenzahl (Shannon) ($p = 0,26$).

Bei Betrachtung der β -Diversität bestand zwischen den Gruppen mit niedriger, mittlerer und hoher CD4-Zellzahl ($p = 0,31$) oder zwischen Proben vor und nach Beginn der ART ($p = 0,64$) kein signifikanter Unterschied.

4.6 Einfluss der Antibiotikatherapie auf das Mikrobiom

Wie in 4.1.7 Antibiotikatherapie (S. 31) beschrieben, erhielten 10 von 13 Patienten während des Studienverlaufs Antibiotika. In diesem Abschnitt soll untersucht werden, inwiefern sich die Antibiotikatherapie auf das Mikrobiom auswirkte.

4.6.1 α -Diversität unter Antibiotikatherapie

In Abbildung 12 und Abbildung 13 wurden die Stuhlproben entsprechend der Antibiotika gruppiert, die die Patienten innerhalb von 3 Monaten vor Abgabe der Probe erhalten hatten. Da kein Einfluss der Applikationsform auf die in der Folge dargestellten Ergebnisse festgestellt wurde, sind die Gruppen mit oraler und intravenöser Cotrimoxazoltherapie sowie mit intravenöser und intramuskulärer Penicillingabe jeweils zusammengefasst. Wie Abbildung 12 zeigt, unterschied sich die Artenvielfalt in Proben bei vorheriger Therapie oder Prophylaxe mit Cotrimoxazol (Median: 113) nur wenig von den Proben ohne Antibiotikaeinfluss (Median: 105). Deutlich geringer war die Artenvielfalt nach Ceftriaxon (81) und insbesondere nach dreifacher antibiotischer Therapie (27). In Proben nach Penicillingabe hingegen war der Median der Artenvielfalt mit 129 höher als in allen anderen Gruppen.

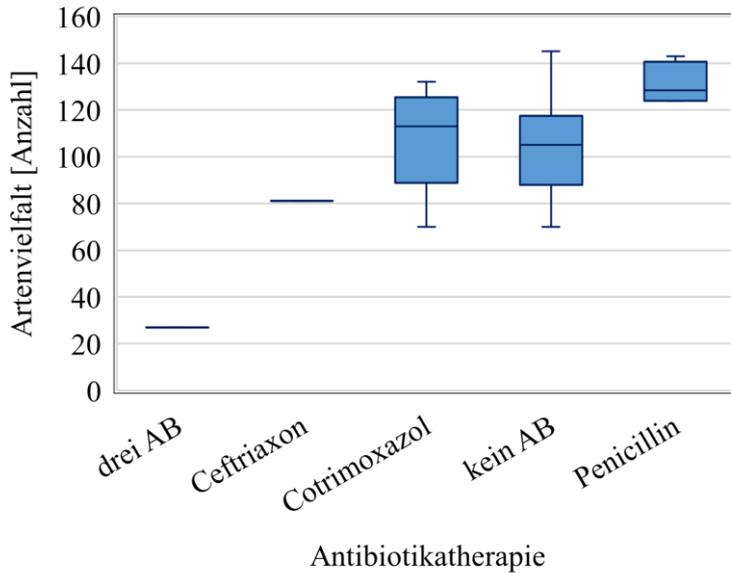


Abbildung 12: Betrachtung der Artenvielfalt (richness) als Maß der α -Diversität; Darstellung aller Proben in Abhängigkeit der vorangegangenen Antibiotikatherapie; für den Vergleich der beiden ähnlichen Gruppen Cotrimoxazol und kein AB mit der Penicillin-Gruppe siehe Abbildung 14

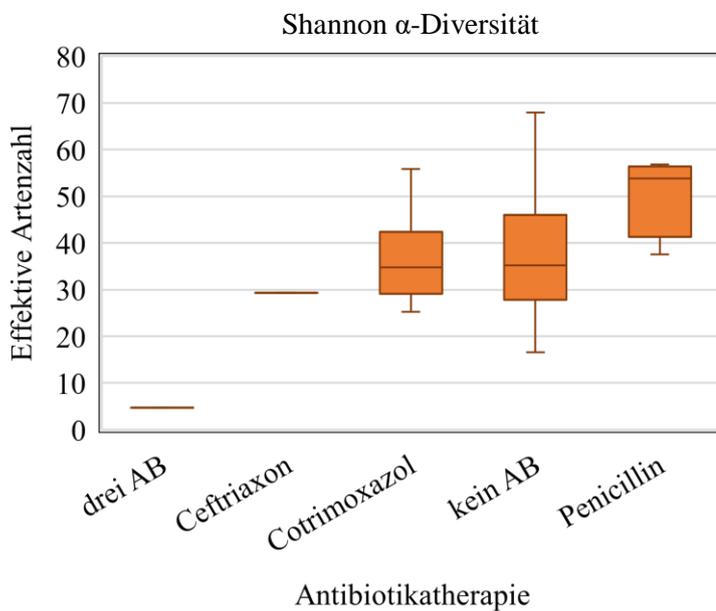


Abbildung 13: Betrachtung der effektiven Artenzahl berechnet aus dem Shannon-Index als Maß der α -Diversität; Darstellung aller Proben in Abhängigkeit der vorangegangenen Antibiotikatherapie; für den Vergleich der beiden ähnlichen Gruppen Cotrimoxazol und kein AB mit der Penicillin-Gruppe siehe Abbildung 15

Dieser Trend lässt sich auch bei Betrachtung der effektiven Artenzahl (Shannon) in Abhängigkeit der vorangegangenen Antibiotikatherapie in Abbildung 13 erkennen. Nach dreifacher Antibiotikatherapie war die effektive Artenzahl (Shannon) am niedrigsten (4,7). Auch nach Gabe von Ceftriaxon war die effektive Artenzahl vermindert (29). In den Proben nach Penicillingabe lag der Median der effektiven Artenzahl mit 54 höher als nach Cotrimoxazol (35) und ohne Antibiotika (35).

Da die Gruppen der Proben ohne Antibiotika und nach Gabe von Cotrimoxazol ähnliche Werte zeigten, wurden die beiden Gruppen in der Folge zusammengefasst und mit den Proben nach Einnahme von Penicillin verglichen. Wie Abbildung 14 zeigt, war die Artenvielfalt nach Penicillin signifikant höher ($p = 0,03$).

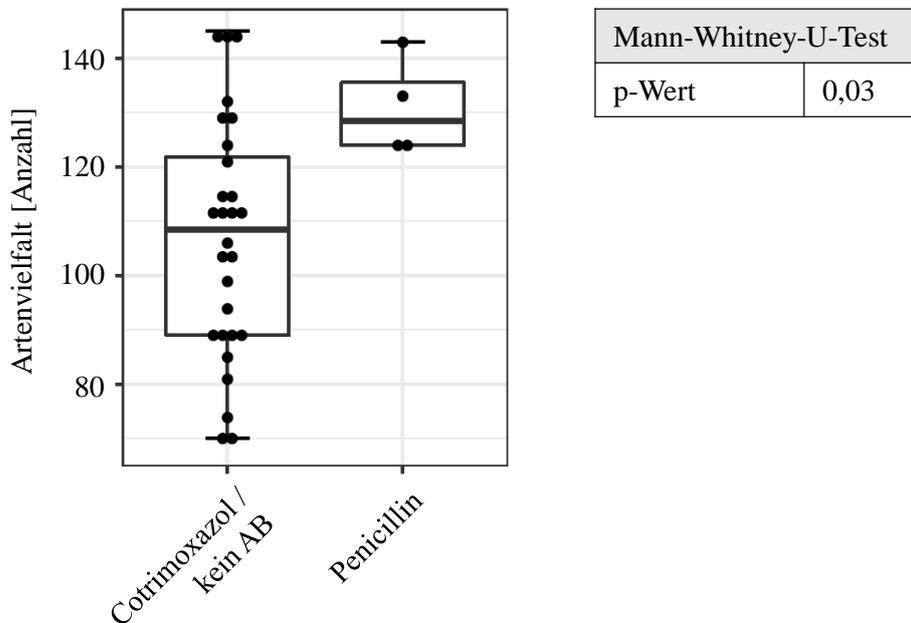


Abbildung 14: Vergleich der Artenvielfalt (richness) von Proben nach Penicillingabe mit Proben ohne vorangegangene Antibiotikatherapie oder nach Cotrimoxazol

In Abbildung 15 ist die effektive Artenzahl (Shannon) von Proben nach Cotrimoxazol bzw. ohne Antibiotikum sowie von Proben nach Penicillin dargestellt. Wie die Artenvielfalt war auch die effektive Artenzahl nach Penicillingabe signifikant höher ($p = 0,03$).

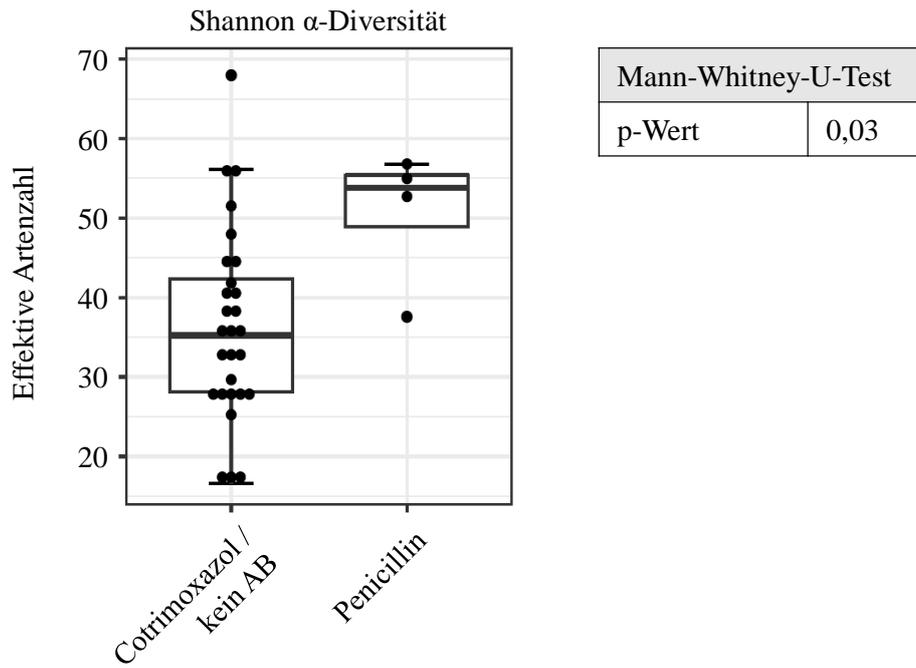


Abbildung 15: Vergleich der effektiven Artenzahl (Shannon) von Proben nach Penicillingabe mit Proben ohne vorangegangene Antibiotikatherapie oder nach Cotrimoxazol

4.6.2 β -Diversität in Abhängigkeit der Antibiotikatherapie

Zur Darstellung der Ähnlichkeit von Proben nach Gabe bestimmter Antibiotika wurden die Proben in der Folge bei der MDS entsprechend der vorangegangenen Antibiotikatherapie eingeteilt. Dies ist in Abbildung 16 dargestellt. Während sich zwischen zwei Gruppen mit und ohne Antibiotikatherapie kein Unterschied zeigte ($p = 0,36$), war die Trennung der Gruppen bei Berücksichtigung des eingesetzten Wirkstoffs signifikant ($p = 0,009$). Am wenigsten unterschied sich die Gruppe nach Cotrimoxazol von den Proben ohne Antibiotikum ($p = 0,46$). Nach Penicillin zeigte sich eine Veränderung der β -Diversität, diese war jedoch nicht signifikant ($p = 0,16$). Eine eindeutige Abtrennung wurde nur für die Probe nach dreifacher Antibiotikatherapie beobachtet.

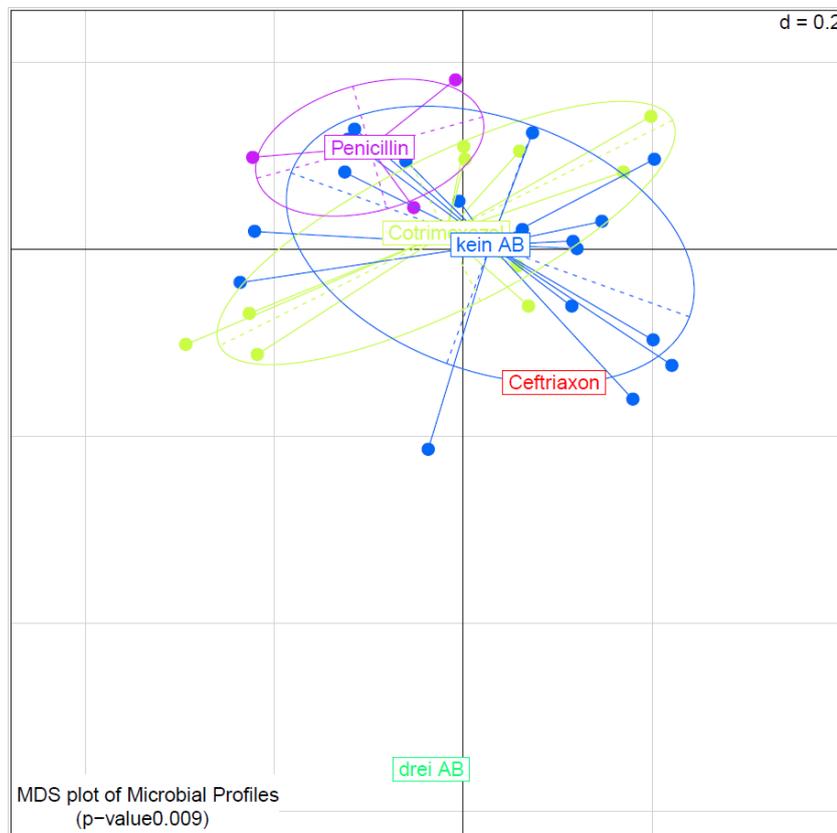


Abbildung 16: β -Diversität aller Proben im MDS-Plot; die Proben wurden entsprechend der vorangegangenen Antibiotikatherapie gruppiert

4.6.3 Einfluss der Antibiotikatherapie auf die Zusammensetzung des Mikrobioms

Im Folgenden soll untersucht werden, wie sich die Antibiotikatherapie auf die Zusammensetzung des Mikrobioms im zeitlichen Verlauf auswirkte. Dazu ist die Häufigkeit einzelner Gattungen in den Proben von Patient 07 vor Therapie mit drei unterschiedlichen Antibiotika (Ceftriaxon, Azithromycin, Metronidazol), sowie in drei zeitlichen Abständen nach der Therapie dargestellt. Es wurden alle Gattungen mit einer Häufigkeit > 1 % berücksichtigt. Abbildung 17 zeigt die Aufteilung des Mikrobioms in Gattungen vor Antibiotikatherapie. Die häufigsten Familien waren die Lachnospiraceae (41 %) und Ruminococcaceae (25 %). Die häufigsten Gattungen stammten überwiegend aus diesen beiden Familien (z. B. *Blautia* 9 %, *Dorea* 6 %, beide aus der Familie der Lachnospiraceae und *Faecalibacterium* 6 % aus der Familie der Ruminococcaceae). Die effektive Artenzahl (Shannon) lag vor der Antibiotikagabe bei 68.

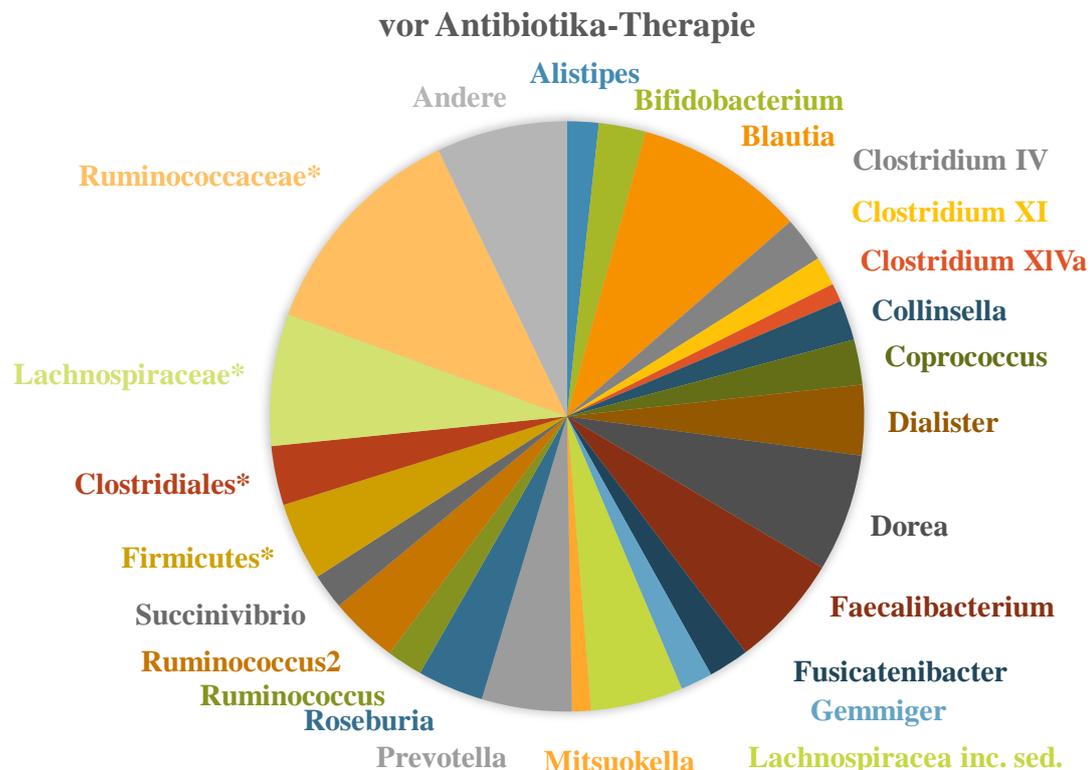


Abbildung 17: Zusammensetzung des Mikrobioms (Patient 07) vor Beginn der Antibiotikatherapie (Visit 1); mit * gekennzeichneten Taxa wurden der entsprechenden Familie zugeordnet, die Gattung ist unbekannt; inc sed.: incertae sedis

Abbildung 18 zeigt die Zusammensetzung des Mikrobioms 11 Tage nach Beginn der Antibiotikatherapie. Zu diesem Zeitpunkt waren *Bacteroides* (36 %) und *Enterococcus* (30 %) am häufigsten. Deren Anteil hatte zuvor bei < 1 % gelegen. Mit Ausnahme von *Clostridium XIVa* und *Clostridium XI* war der Anteil aller Gattungen aus Abbildung 17 vor Antibiotikatherapie auf < 0,2 % gefallen. Die effektive Artenzahl (Shannon) war von 68 auf 4,7 gesunken.

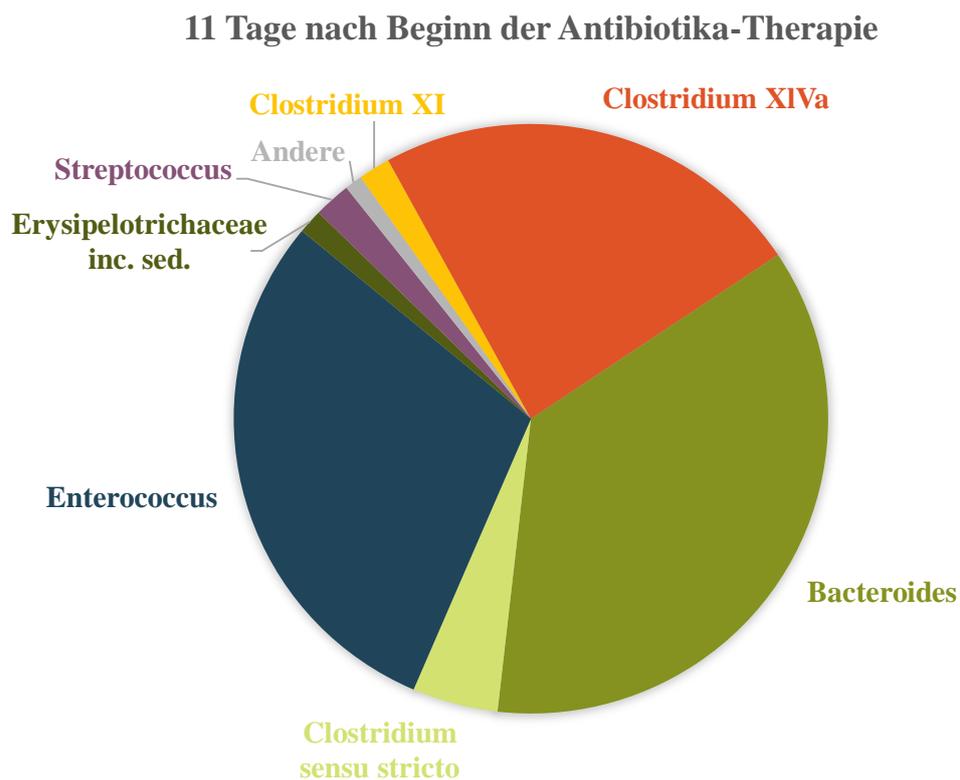


Abbildung 18: Zusammensetzung des Mikrobioms (Patient 07) 11 Tage nach Beginn der Antibiotikatherapie (Visit 2)

Drei Monate nach Antibiotikatherapie war die effektive Artenzahl wieder auf 28 angestiegen. Die häufigste Gattung war *Roseburia* (19 %) aus der Familie Lachnospiraceae (Abbildung 19). Die Häufigkeit der Gattung *Blautia* lag zu diesem Zeitpunkt bereits wieder im Bereich des Ausgangswertes. Während die Häufigkeit von *Enterococcus* innerhalb von 3 Monaten auf 0,04 % gefallen war, lag der Anteil von *Bacteroides* weiterhin bei 13 %.

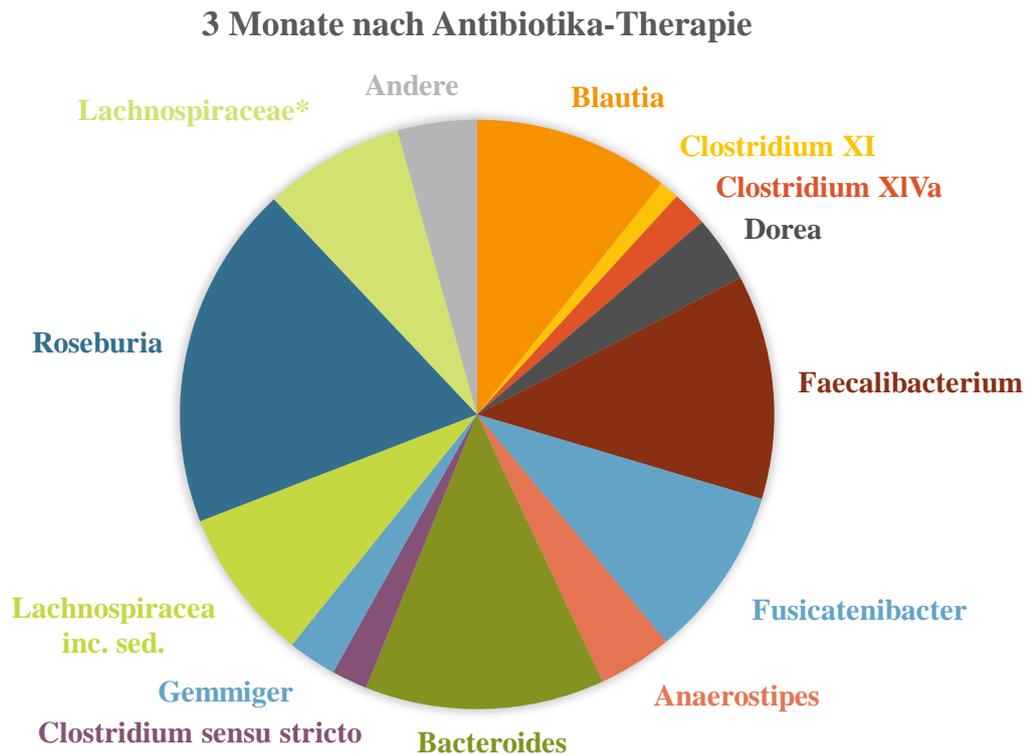


Abbildung 19: Zusammensetzung des Mikrobioms (Patient 07) 3 Monate nach Antibiotikatherapie (Visit 3); mit * gekennzeichneten Taxa wurden der entsprechenden Familie zugeordnet, die Gattung ist unbekannt

Abbildung 20 zeigt die Zusammensetzung des Mikrobioms 6 Monate nach der Antibiotikagabe. Die effektive Artenzahl war zu diesem Zeitpunkt weiter gestiegen. Mit einem Wert von 41 war sie jedoch niedriger als vor Antibiotikatherapie. Die relative Häufigkeit einiger Gattungen wie *Blautia*, *Prevotella* und *Roseburia* lag wieder im gleichen Bereich wie vor den Antibiotika. Im Gegensatz dazu konnte *Bifidobacterium*, welches zuvor einen Anteil von 2,5 % hatte, auch 6 Monate nach der Antibiotikatherapie nicht nachgewiesen werden.

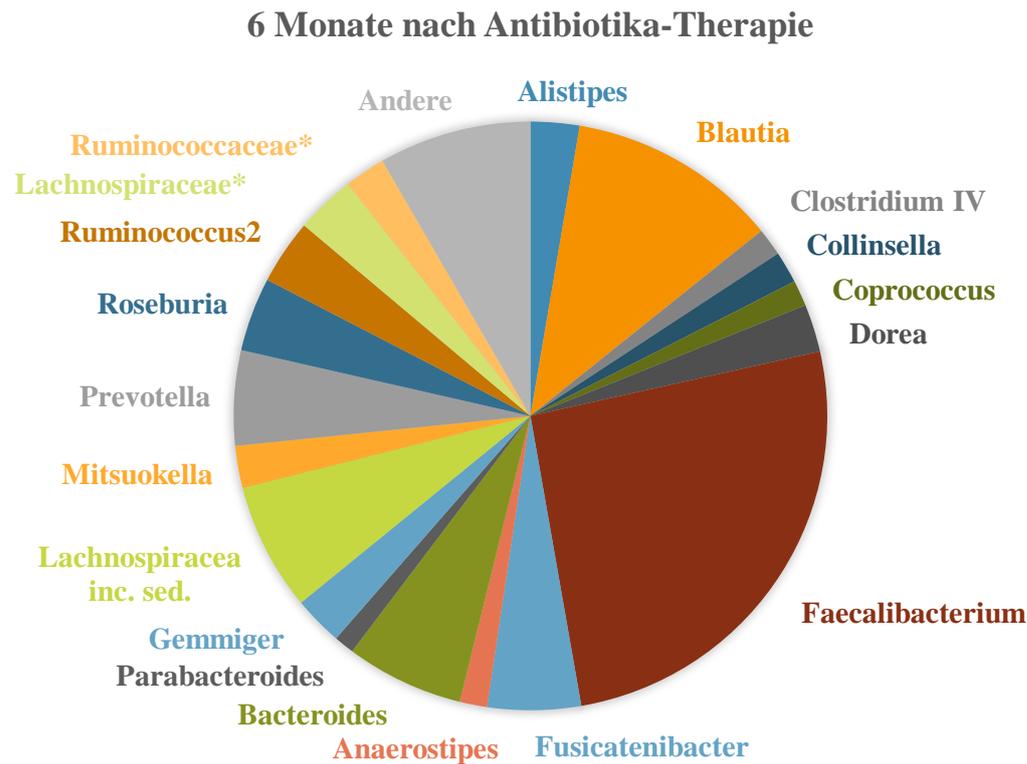


Abbildung 20: Zusammensetzung des Mikrobioms (Patient 07) 6 Monate nach Antibiotikatherapie (Visit 4); mit * gekennzeichneten Taxa wurden der entsprechenden Familie zugeordnet, die Gattung ist unbekannt; inc sed.: incertae sedis

4.6.4 Einfluss von Penicillin auf die Häufigkeit einzelner OTUs und Taxa

Es wurde bereits gezeigt, dass in Proben nach Penicillingabe Artenvielfalt und effektive Artenzahl (Shannon) erhöht waren. Daraus ergab sich die Frage, ob auch die Häufigkeit einzelner Taxa durch Penicillin verändert wurde. Zunächst wurde die häufigste OTU in den Proben jeweils eines Patienten betrachtet. Die Proben von Patient 07 wurden dabei nicht berücksichtigt. Es zeigte sich, dass bei 7 von 8 Patienten ohne Penicillingabe die häufigste OTU zu allen Zeitpunkten aus dem Familien Lachnospiraceae oder Ruminococcaceae stammte. Beide gehören zur Ordnung Clostridiales. Nach Penicillingabe änderte sich bei allen 4 Patienten die häufigste OTU und stammte zudem aus einem anderen Phylum als die häufigste OTU vor Penicillingabe.

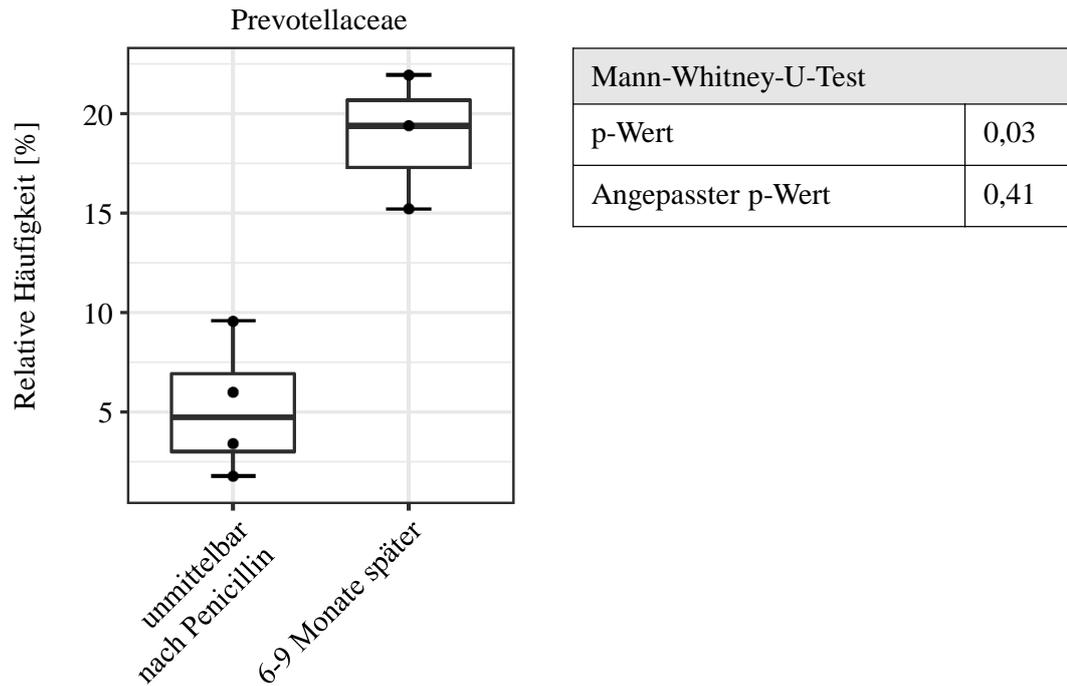


Abbildung 21: Häufigkeit der Prevotellaceae unmittelbar nach Penicillingabe und 6-9 Monate später

Weiterhin wurde die Zusammensetzung des Mikrobioms im zeitlichen Verlauf der Antibiotikatherapie untersucht. Bei 3 von 4 Patienten, die Penicillin erhielten, war die Häufigkeit der Familie Prevotellaceae nach 6-9 Monaten deutlich angestiegen. Wie in Abbildung 21 dargestellt, stieg der Median von 4,7 % kurz nach Penicillintherapie auf 17,3 % nach 6 bzw. 9 Monaten. Bei einem Patienten wurde diese Familie zu diesem Zeitpunkt nicht mehr nachgewiesen. Zur Kontrolle wurde die Häufigkeit der Prevotellaceae im Studienverlauf bei 4 Patienten ohne Antibiotika betrachtet. In dieser Patientengruppe bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Proben bei Visit 1 und den späteren Proben ($p = 0,83$).

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Längsschnittstudie wurde das Mikrobiom bei HIV-Patienten sowohl vor als auch nach Beginn der ART untersucht und in Zusammenhang mit klinischen Einflussfaktoren gebracht. Die Auswertung zeigte, dass sich die Patienten im Hinblick auf CD4-Zellzahl und Begleiterkrankungen stark unterschieden. Das Mikrobiom wurde insbesondere durch die Therapie mit Antibiotika aufgrund von akuten Infektionen beeinflusst. Je nach eingesetzter Substanz wurden charakteristische Veränderungen von Artenvielfalt, Diversität und Zusammensetzung des Mikrobioms nachgewiesen. Darüber hinaus gab es Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der eingenommenen ART und der Häufigkeit der Familie Ruminococcaceae. Ein Zusammenhang zwischen der CD4-Zellzahl, dem ART-Status oder der Zeitdauer nach ART-Beginn und charakteristischen Veränderungen des Mikrobioms konnte nicht nachgewiesen werden.

5.2 Studiendesign

Die vorliegende Studie wurde als Längsschnittstudie über einen Zeitraum von neun Monaten durchgeführt. Auf diese Weise konnte das Mikrobiom der Patienten vor und nach Beginn der ART im Verlauf untersucht werden. Es ist bekannt, dass sich das Mikrobiom zwischen verschiedenen Individuen deutlich unterscheidet, wohingegen das Mikrobiom eines Individuums oft über längere Zeit konstant ist (Ley et al. 2006). Damit bot die Längsschnittstudie eine bessere Vergleichbarkeit des Mikrobioms zu verschiedenen Zeitpunkten.

Im Verlauf traten bei der Mehrzahl der Patienten Infektionen auf, die eine Behandlung mit Antibiotika notwendig machten. Dieser Faktor, der das Mikrobiom stark beeinflusste, ließ sich in der Längsschnittstudie nicht ausschalten. Die meisten bisherigen Studien verglichen das Darmmikrobiom bei HIV-Patienten in Querschnittstudien mit dem Mikrobiom HIV-negativer Kontrollen (vgl. Tabelle 2: Übersicht über bisherige Studien zur Darmmikrobiota bei HIV auf Seite 16). Zwar besteht bei Querschnittstudien der

Vorteil, dass oftmals eine höhere Fallzahl erreicht wird, da die einmalige Abgabe einer Stuhlprobe weniger Compliance erfordert. Des Weiteren stehen für die Gruppe unter ART deutlich mehr Patienten zur Verfügung, wenn diese nicht als therapienaive Patienten rekrutiert werden. Beim Vergleich zweier Gruppen von Menschen mit und ohne HIV werden allerdings zahlreiche Einflussfaktoren nicht berücksichtigt. Dazu gehören neben den bereits erwähnten interindividuellen Unterschieden des Mikrobioms auch die sexuelle Präferenz, welche das Mikrobiom beeinflusst (Noguera-Julian et al. 2016). Auch die Dauer der ART variierte in den bisherigen Studien. Diese Variable konnte in der vorliegenden Studie besser berücksichtigt werden, da die Therapiedauer durch den Studienablauf genau definiert war. Aufgrund dieser Vorteile sollten Folgestudien trotz der möglichen Beeinträchtigung durch Antibiotika bevorzugt als Längsschnittstudien geplant werden.

5.3 Fallzahl

Im Studienprotokoll wurde eine kleine Fallzahl von maximal 20 Patienten festgelegt, um in einer Pilotstudie erste Hinweise auf mögliche Veränderungen des Mikrobioms bei HIV-Patienten während des ART-Beginns zu gewinnen. Da ein Großteil der Patienten des IZAR bereits eine ART erhielt, wäre es nicht möglich gewesen, im Prüfzentrum allein mehr therapienaive Patienten zu rekrutieren. Trotz der geringen Zahl an geeigneten Patienten konnten insgesamt 15 Studienteilnehmer eingeschlossen werden. Bei Betrachtung ähnlicher Studien wurden diese ebenfalls mit kleinen Fallzahlen (vgl. Tabelle 2, S. 16) durchgeführt. In der Studie von Ellis et al. wurde das Mikrobiom bei 4 von insgesamt 12 Patienten longitudinal untersucht (Ellis et al. 2011). Eine weitere Längsschnittstudie wurde mit 13 Patienten durchgeführt (Pérez-Santiago et al. 2013). Am größten war die Fallzahl in der Studie von Nowak et al., welche 19 von 31 Patienten zusätzlich in einer Längsschnittstudie beobachtete (Nowak et al. 2015).

Bei geringen Fallzahlen fallen einzelne Proben stärker ins Gewicht. Da bei der Untersuchung des Mikrobioms von HIV-Patienten immer Störfaktoren wie Infektionen, Antibiotika oder Diarrhö auftreten, sollte in Folgestudien eine größere Fallzahl angestrebt werden. Auf diese Weise könnte auch das Fehlen einzelner Proben besser ausgeglichen werden. Allerdings wird es kaum möglich sein, eine ausreichende Zahl therapienaiver

Patienten kurz vor ART-Beginn in einem einzelnen Studienzentrum zu rekrutieren. Die Fallzahl kann jedoch durch die Rekrutierung von Patienten parallel in verschiedenen Kliniken erhöht werden. Die Querschnittstudie von Noguera-Julian et al. wurde mit zwei Kohorten in verschiedenen Städten durchgeführt und konnte so insgesamt 206 Patienten mit HIV einschließen (Noguera-Julian et al. 2016). Eine ähnliche Studienplanung ist auch für eine Längsschnittstudie denkbar.

5.4 Ein- und Ausschlusskriterien

Die erforderlichen Kriterien für den Einschluss in die Studie waren ein Alter über 18 Jahren, eine nachgewiesene HIV-Infektion, die Aufklärung durch einen Prüfarzt und die schriftliche Einverständniserklärung des Patienten. Hauptausschlusskriterium war eine bereits eingeleitete ART. In der vorliegenden Studie hätte die gezieltere Auswahl von Patienten durch das Festlegen zusätzlicher Ein- und Ausschlusskriterien zu einer geringeren Zahl an Studienteilnehmern geführt und damit die Aussagekraft der Ergebnisse gesenkt. Dennoch sollte bei Folgestudien in Betracht gezogen werden, weitere Kriterien für den Studieneinschluss zu definieren. Durch das Festlegen einer niedrigen CD4-Zellzahl als Einschlusskriterium wäre die Rekonstitution des Immunsystems der einzelnen Patienten besser vergleichbar. In der Folge könnte der Zusammenhang zwischen dem Mikrobiom und der Wiederherstellung des Immunsystems genauer beurteilt werden. Auch sollte erwogen werden, bestimmte Erkrankungen als Ausschlusskriterien zu definieren. Wie bereits in Kapitel 1.7.4 Dysbiose bei chronischen Erkrankungen (S. 11) dargelegt, sind unter anderem chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, Leberzirrhose und Adipositas mit einer charakteristischen Mikrobiota assoziiert. Diese Begleiterkrankungen könnten das Mikrobiom ebenso stark beeinflussen wie die HIV-Infektion. In den Studien von Pérez-Santiago et al. und Nowak et al. wurden keine Patienten mit vorangegangener Antibiotikatherapie eingeschlossen (Pérez-Santiago et al. 2013; Nowak et al. 2015). Da aber nahezu alle Patienten im Verlauf der vorliegenden Studie von einer akuten Infektion betroffen waren, wäre es nicht möglich gewesen, eine Antibiotikatherapie als Ausschlusskriterium zu definieren. Deshalb sollte in Zukunft versucht werden, diesem Störfaktor mit einer möglichst hohen Fallzahl entgegenzuwirken.

5.5 Studienablauf

Nach Einschluss in die Studie gaben die Patienten die erste Stuhlprobe kurz vor Beginn der ART ab. Die weiteren Proben folgten nach 3, 6 und 9 Monaten. Die Intervalle für die Probenabgabe wurden so gewählt, dass die Proben zu den regulären Untersuchungsterminen im Studienzentrum abgegeben wurden. Dadurch war der Aufwand für die Patienten so gering wie möglich. In bisherigen Studien war das Mikrobiom vor und nach ART-Beginn über einen ähnlichen Zeitraum untersucht worden. Bei Ellis et al. wurden im Abstand von 9 Monaten Biopsie- und Stuhlproben entnommen (Ellis et al. 2011). Bei Nowak et al. war der Untersuchungszeitraum je nach Patient unterschiedlich und lag im Median bei 10 Monaten (Nowak et al. 2015). In der Studie von Pérez-Santiago et al. erfolgte die Probennahme ungefähr alle 4 Wochen über einen Zeitraum von 48 Wochen (Pérez-Santiago et al. 2013).

Insbesondere zu Beginn der ART könnten kürzere Intervalle zusätzliche Informationen liefern, da das Absinken der Viruslast und die Rekonstitution des Immunsystems zu Beginn der Therapie am schnellsten verlaufen (Kaufmann et al. 2000; Le Moing et al. 2002) (vgl. 1.6.3 Wirkung der ART auf Viruslast und Immunsystem, S. 8). In Folgestudien sollte versucht werden, den Studienablauf um eine zusätzliche Probe 4 Wochen nach Therapiebeginn zu ergänzen. Ob darüber hinaus eine Probennahme nach einer Woche gewinnbringend wäre, kann nicht ohne weiteres beurteilt werden. Sollte die Abgabe einer Probe nach einer Woche möglich sein, wäre es denkbar, das Mikrobiom zu diesem Zeitpunkt zumindest bei einem Teil der Patienten zu untersuchen.

5.6 Datenerhebung

Da die Stuhlproben zu den regulären Untersuchungsterminen abgegeben wurden, standen zu jeder Probe umfassende klinische Informationen zur Verfügung. Dadurch war es möglich, die Studienpopulation detailliert zu beschreiben und die Ergebnisse der Mikrobiomanalyse im klinischen Zusammenhang zu betrachten. Wie in der vorliegenden Studie waren Viruslast und CD4-Zellzahl auch in den bisherigen Studien erfasst worden. In der vorliegenden Studie wurden außerdem das ART-Regime, Infektionen, Antibiotikatherapie und das Auftreten von Diarrhöen berücksichtigt. Um noch

umfassendere Informationen zu den einzelnen Proben zu erhalten, wäre die Erfassung der sexuellen Präferenz, Ernährungsgewohnheiten und Einnahme von Nahrungsergänzungsmitteln mit Hilfe eines Fragebogens notwendig. Eine Studie, die den Zusammenhang zwischen der Ernährung und der Zusammensetzung des Mikrobioms untersuchte, fand eine starke Verknüpfung zwischen den langfristigen Ernährungsgewohnheiten und der Zuordnung zu den drei Enterotypen (Wu et al. 2011). Bei proteinreicher Ernährung mit einem hohen Anteil tierischer Fette dominierten Bacteroides die Darmmikrobiota (Wu et al. 2011). Bei Probanden, die sich kohlenhydratreich ernährten, darunter auch Vegetarier, war Prevotella vorherrschend (Wu et al. 2011). Ein zusätzlicher Fragebogen hätte zwar den Nachteil des höheren Aufwands für die Patienten und eines stärkeren Eingriffs in deren Privatsphäre. Aufgrund der Relevanz der Informationen für die Ergebnisse der Studie sollte ein Fragebogen in weiterführenden Studien jedoch Anwendung finden. Insgesamt erscheint die Erfassung weiterer Metainformationen insbesondere bei einer größeren Fallzahl sinnvoll, da die genauere Einteilung der Proben wiederum zu kleineren Untergruppen führt.

5.7 Untersuchungsmaterial

Die Stuhlproben wurden von den Patienten selbst entnommen und im Studienzentrum abgegeben. Von dort an wurden die Proben kühl gelagert und innerhalb weniger Stunden bei -80 °C eingefroren. War es einem Patienten nicht möglich, die Probe zum vereinbarten Termin mitzubringen, so schickte er die Probe in einem vorfrankierten Umschlag per Post an das Studienzentrum. Die Isolierung der bakteriellen DNA und die Sequenzierung erfolgten bei allen Proben zeitgleich. Nach Isolierung der DNA war deren Konzentration in 2 Proben zu gering für die weitere Analyse. Um die Qualität der Stuhlproben zu verbessern, sollte in Folgestudien bereits vor dem Einfrieren eine DNA-Stabilisierungslösung zur Probe hinzugegeben werden. Auch ist es vorzuziehen, die Proben aufgrund der verlängerten Zeit ohne Kühlung nicht per Post an das Studienzentrum zu schicken. Dies war in der vorliegenden Studie jedoch in Einzelfällen notwendig und wurde in der weiteren Auswertung nicht berücksichtigt.

Grundsätzlich kann das Mikrobiom aus Stuhlproben bzw. Stuhlabstrichen oder aus Biopsien der Mukosa untersucht werden. Da die Biopsie im Rahmen einer Koloskopie

ein invasiver Eingriff ist, der nicht nur einen höheren Aufwand, sondern auch ein Risiko für den Patienten bedeutet, wurden in der vorliegenden Studie ausschließlich Stuhlproben als Untersuchungsmaterial verwendet. Wie aus Tabelle 2 (S. 16) hervorgeht, wurde auch in bisherigen Studien das Mikrobiom überwiegend anhand von Stuhlproben analysiert. Von 17 Studien wurden 10 Studien allein mit Stuhlproben und 2 Studien mit Stuhlabstrichen durchgeführt. In jeweils 2 Studien wurden Biopsien bzw. Biopsien und Stuhlproben untersucht. Eine weitere Studie analysierte das Mikrobiom aus Abstrichen und Cytobrushmaterial des oberen Gastrointestinaltrakts. Es ist bekannt, dass das Mikrobiom aus Stuhlproben und das Mukosa-assoziierte Mikrobiom aus Biopsien Unterschiede aufweisen (Zoetendal et al. 2002). Auch in den beiden Studien, die sowohl Biopsie- als auch Stuhlproben von HIV-positiven Patienten untersuchten, waren einzelne Ergebnisse von der Art der Probe abhängig. So wurde beispielsweise ein Zusammenhang zwischen Immunaktivierung und der Abundanz von *Prevotella* nur in Biopsien nachgewiesen (Dillon et al. 2014). In der Studie von Mutlu et al. war die Minderung der Diversität in den Biopsien deutlicher ausgeprägt als in den Stuhlproben. Trotz dieser Ergebnisse werden Stuhlproben auch bei zukünftigen Studien eine bedeutende Rolle spielen. Dies gilt insbesondere für Studien mit großen Fallzahlen und Längsschnittstudien, da der geringere Aufwand und das fehlende Risiko für die Patienten hier entscheidende Vorteile darstellen.

5.8 Einfluss der ART auf das Mikrobiom

5.8.1 Abhängigkeit der α -Diversität von CD4-Zellzahl und ART

Die Varianzanalyse ergab keinen signifikanten Unterschied der Artenvielfalt oder der α -Diversität zwischen den Gruppen mit unterschiedlicher CD4-Zellzahl oder unterschiedlichem ART-Status bzw. unterschiedlicher ART-Dauer. Dies gilt sowohl für die Analyse der gesamten Studienpopulation als auch für die Auswertung der Gruppe von Patienten ohne Antibiotikatherapie bzw. mit Cotrimoxazol. Auch in den Studien von Mutlu et al., Vasquez-Castellanos et al. und Dubourg et al. war die Diversität nicht von der CD4-Zellzahl im peripheren Blut abhängig. Im Widerspruch dazu stehen die Ergebnisse von Monaco et al., welche eine erniedrigte Artenvielfalt und Diversität bei Patienten mit einer CD4-Zellzahl $< 200/\mu\text{l}$ fanden. In der Studie von Nowak et al.

korrelierte vor ART-Beginn die CD4-Zellzahl positiv mit Artenvielfalt und Diversität (Nowak et al. 2015). Dieses Ergebnis konnte die vorliegende Studie nicht bestätigen. Wie in der Studie von Dubourg et al. bestand kein Unterschied der Diversität zwischen Proben unter ART und ohne ART. Im Gegensatz dazu war die Diversität unter ART in der Studie von McHardy et al. größer, bei Nowak et al. kleiner als bei Patienten ohne ART.

Verschiedene Faktoren können zur Widersprüchlichkeit dieser Ergebnisse beigetragen haben. Dazu gehören das verwendete Untersuchungsmaterial und Unterschiede zwischen den Studienpopulationen bezüglich Begleiterkrankungen, Dauer der Infektion und Dauer der ART. Auch muss bedacht werden, dass es für Artenzahl und Diversität keine Normwerte gibt und die Werte der Patienten vor HIV-Infektion unbekannt sind. Es bleibt daher unklar, ob und in welchem Ausmaß sich die Diversität des Mikrobioms durch die HIV-Infektion tatsächlich verändert hatte.

In der vorliegenden Studie bestand weiterhin die Schwierigkeit, dass sich der Immunstatus der Patienten während der gesamten Studie erheblich unterschied. Da in den Leitlinien mittlerweile ein früherer Beginn der ART empfohlen wird (Deutsche AIDS-Gesellschaft (DAIG) 2015), ist die Zahl der Patienten mit einer niedrigen CD4-Zellzahl zu Therapiebeginn gesunken. Zum Zeitpunkt 0 lag die CD4-Zellzahl in der vorliegenden Studie nur bei 5 Patienten $< 200/\mu\text{l}$. Bei weiteren 5 Patienten war sie im mittleren Bereich, 3 Patienten hatten eine hohe CD4-Zellzahl $> 500/\mu\text{l}$. Somit war die Rekonstitution des Immunsystems der Patienten nur schwer zu vergleichen.

In der Studie von Noguera-Julian et al. war die Artenzahl größer, wenn die CD4-Zellzahl unter ART auf $> 500/\mu\text{l}$ anstieg als bei Patienten mit schlechtem immunologischem Ansprechen $< 200/\mu\text{l}$. Möglicherweise zeigte sich in der vorliegenden Studie bei der Analyse von Artenzahl und Diversität kein signifikanter Unterschied, da sich die Proben bei Gruppierung nach ART-Dauer hinsichtlich der CD4-Zellzahl stark unterschieden. Bei Einteilung entsprechend der CD4-Zellzahl enthielten die Stichproben sowohl Proben von therapienaiven Patienten als auch von Patienten unter ART. Aus diesem Grund wird es in Folgestudien notwendig sein, eine größere Anzahl von Patienten mit niedriger CD4-Zellzahl einzuschließen bzw. eine niedrige CD4-Zellzahl als Einschlusskriterium festzulegen.

5.8.2 Zusammenhang der β -Diversität mit CD4-Zellzahl und ART

In der vorliegenden Studie unterschied sich die β -Diversität nicht zwischen den Gruppen mit unterschiedlicher CD4-Zellzahl. Zu diesem Ergebnis kam auch die Studie von McHardy et al., welche jedoch einen Unterschied zwischen Patienten mit und ohne ART feststellte. Zwischen ART+ und ART- Proben der gleichen Patienten konnte die vorliegende Studie keinen Unterschied nachweisen. Eine mögliche Erklärung ist, dass das Mikrobiom einzelner Personen über längere Zeit stabil bleibt. In der Studie von Ley et al. waren trotz der Intervention durch Diät die Proben der gleichen Person am ähnlichsten (Ley et al. 2006). Auch bei Patienten mit HIV wurde das Mikrobiom durch Faktoren wie die ART oder CD4-Zellzahl wohl nicht so stark beeinflusst, dass die interindividuellen Unterschiede aufgehoben wurden. Die signifikante Trennung von ART+ und ART- Patienten in der Studie von Dubourg et al. kann damit erklärt werden, dass in einer Querschnittstudie jede Probe von einem anderen Patienten stammt. Dadurch ist eine Gruppierung von Proben mit gleichem ART-Status wahrscheinlicher. In der teilweise longitudinal durchgeführten Querschnittstudie von Nowak et al. waren sich Proben verschiedener Patienten unter ART ähnlicher als noch vor ART-Beginn (Nowak et al. 2015). Auch in der vorliegenden Studie waren sich Proben von Patienten ohne Antibiotikatherapie und nach Cotrimoxazol nach 6 bis 9 Monaten ähnlicher als vor ART-Beginn. Diese Ergebnisse legen nahe, dass sich das Mikrobiom trotz der weiterbestehenden interindividuellen Unterschiede unter ART verändert und mehr Gemeinsamkeiten aufweist als vor Therapiebeginn.

5.8.3 Einfluss der ART auf die Häufigkeit einzelner Taxa

Während sich die Häufigkeiten einzelner Taxa nicht grundsätzlich zwischen Proben mit und ohne ART unterschieden, war der Unterschied zwischen den Gruppen mit verschiedenen NRTI signifikant. Nach Einnahme von TDF/FTC war die Familie Ruminococcaceae seltener als nach Einnahme von ABC/3TC und seltener als vor ART. Eine mögliche Ursache hierfür sind die unter TDF/FTC sehr häufig auftretenden gastrointestinalen Nebenwirkungen einschließlich Diarrhö. Die Häufigkeit liegt laut Fachinformation bei > 10 % (Gilead Sciences Ireland UC 2018). Unter ABC/3TC beträgt die Häufigkeit gastrointestinaler Nebenwirkungen 1 - 10 % (ViiV Healthcare BV 2018). Eine Studie zeigte, dass Ruminococcaceae bei gesunden Probanden ohne Diarrhö häufiger sind als bei Patienten mit nicht-Clostridium-difficile-assoziiertes Diarrhö

(Schubert et al. 2014). Zwar wurde das Auftreten von gastrointestinalen Nebenwirkungen der ART in der vorliegenden Studie nicht explizit erfasst, es ist jedoch möglich, dass die verschiedenen NRTI auf diesem Weg die Häufigkeit der Ruminococcaceae signifikant beeinflussten.

In der Studie von Nowak et al. waren die Häufigkeit einzelner Gattungen unter NNRTI und PI verglichen worden. Diese beiden Gruppen unterschieden sich ebenso wie in der vorliegenden Studie nicht signifikant (Nowak et al. 2015). In weiteren Studien wurde zwar der Einfluss der ART, nicht aber bestimmter Substanzen untersucht. Dabei wurde der Effekt der ART unterschiedlich beurteilt. Bei McHardy et al. zeigte das Mikrobiom unter ART die gleichen Veränderungen wie bei unbehandelten Patienten, allerdings waren diese weniger deutlich ausgeprägt. In zwei weiteren Studien zeigte die Zusammensetzung der Mikrobiota je nach Patient Ähnlichkeit mit unbehandelten HIV-Patienten oder HIV-negativen Kontrollen (Lozupone et al. 2013; Vujkovic-Cvijin et al. 2013). Dies war unabhängig von der Dauer der ART. In der Studie von Lozupone et al. waren Ruminococcaceae bei HIV+ im Vergleich zu HIV- häufiger, bei Dillon et al. und Dubourg et al. war diese Familie seltener (Dillon et al. 2014; Dubourg et al. 2016). Es ist somit nicht auszuschließen, dass antiretrovirale Medikamente die Darmmikrobiota auf unterschiedliche Weise beeinflussen und so zu den verschiedenen Ergebnissen bisheriger Studien beigetragen haben.

5.9 Effekt der Antibiotikatherapie

5.9.1 Artenvielfalt und α -Diversität

Die Artenvielfalt und die α -Diversität wurden durch die Gabe von Antibiotika beeinflusst. Dabei waren die Art und das Ausmaß der Veränderung von der eingesetzten Substanz abhängig. In Proben nach Cotrimoxazol zeigte sich kein Unterschied zu Proben ohne vorherige Antibiotikagabe. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam auch eine Studie, die die anale Mikrobiota bei HIV-positiven und HIV-negativen Menschen untersuchte (Yu et al. 2014). Hier war die Diversität nach Cotrimoxazol zwar etwas niedriger, der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Ein möglicher Grund für die geringe Auswirkung von Cotrimoxazol auf die Diversität der Darmmikrobiota wäre, dass Cotrimoxazol häufig zur

Prophylaxe einer PCP und damit in geringer Dosierung eingenommen wird. In der vorliegenden Studie konnte jedoch kein Unterschied zwischen den 8 Proben nach prophylaktischer (oral) und den beiden Proben nach therapeutischer (intravenös) Gabe von Cotrimoxazol festgestellt werden.

Deutlich erniedrigt waren Artenvielfalt und Diversität nach Ceftriaxon und nach dreifacher antibiotischer Therapie mit Ceftriaxon, Azithromycin und Metronidazol. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit früheren Studien, die bei Therapie mit Fluorchinolonen, β -Lactam-Antibiotika und Kombinationen mit Clindamycin, Clarithromycin und Metronidazol eine verminderte Artenvielfalt und Diversität fanden. In den Studien von Dethlefsen et al. erhielten Patienten über 5 Tage Ciprofloxacin (Dethlefsen et al. 2008; Dethlefsen & Relman 2011). Bei Jakobsson et al. wurde eine Therapie mit Clarithromycin und Metronidazol zur Eradikation von *Helicobacter pylori* durchgeführt (Jakobsson et al. 2010). In weiteren Studien kam eine Vielzahl verschiedener Mono- und Kombinationstherapien zum Einsatz, wodurch innerhalb einer Studie nur wenige oder einzelne Patienten die gleiche Therapie erhielten (Panda et al. 2014; Perez-Cobas et al. 2013).

Die Analyse von Stuhlproben nach Penicillin-Monotherapie in der vorliegenden Studie zeigte Veränderungen des Mikrobioms, die sich deutlich von den oben vorgestellten Ergebnissen abheben. Bei diesen 4 Patienten wurde nach der Gabe eines Benzylpenicillins die Tendenz zu einer größeren Artenvielfalt und α -Diversität beobachtet. Der Unterschied bestand nicht nur im Vergleich zu den beiden Patienten mit Ceftriaxon und dreifacher Antibiotikatherapie, sondern auch im Vergleich zu Proben nach Cotrimoxazol und ohne Antibiotikum. Die Penicillin-Monotherapie unterscheidet sich von den anderen Antibiotika-Regimes der vorliegenden sowie früherer Studien durch das abgedeckte Keimspektrum. Benzylpenicilline wirken vor allem im grampositiven Bereich (Karow & Lang-Roth 2016) und unterscheiden sich dadurch von anderen β -Lactamen wie Ceftriaxon. Dieses gehört zur Gruppe 3 der Cephalosporine und besitzt bei einem breiten Spektrum auch eine sehr gute Wirkung gegen gramnegative Bakterien (Karow & Lang-Roth 2016). Auch die in den Studien von Perez-Cobas et al. und Panda et al. eingesetzten Aminopenicilline haben ein verbreitetes Spektrum im gramnegativen Bereich (Karow & Lang-Roth 2016). Alle Antibiotikatherapien, nach deren Anwendung eine verminderte Diversität beobachtet wurde, darunter auch Fluorchinolone (Dethlefsen et al. 2008; Dethlefsen & Relman 2011; Panda et al. 2014) und Kombinationen mit

Metronidazol (Jakobsson et al. 2010) und Clindamycin (Perez-Cobas et al. 2013), haben ein größeres Wirkspektrum als Benzylpenicilline (Karow & Lang-Roth 2016). Es liegt nahe, dass Artenzahl und Diversität nach Penicillingabe nicht abnahmen, da das Antibiotikum auf den überwiegenden Teil der Darmmikrobiota nur schwach wirkte. Dadurch könnten Benzylpenicilline zudem die Entwicklung von Resistenzen fördern. Im Laufe der Studie wurde bei keinem der Patienten ein Absinken der Diversität beobachtet. Folglich ist es möglich, dass durch Penicillin entweder eine langfristige Erhöhung der Diversität verursacht wurde oder die Diversität über lange Zeit stabil blieb.

Da alle Patienten das Penicillin kurz vor Abgabe der ersten Stuhlprobe erhalten hatten, lagen keine Vergleichswerte für die Diversität vor Antibiotikagabe vor. Es kann somit nicht abschließend beurteilt werden, inwiefern sich die Werte der einzelnen Patienten durch Penicillin veränderten. Weiterhin muss bei der Beurteilung der Diversität bedacht werden, dass diese auch durch die sexuelle Präferenz beeinflusst wird (Noguera-Julian et al. 2016). Dieses Kriterium wurde in der vorliegenden Studie nicht erfasst. Dennoch zeigen die Ergebnisse, dass der Effekt der Antibiotikatherapie auf Artenvielfalt und α -Diversität maßgeblich von den eingesetzten Substanzen abhängt.

5.9.2 Veränderung der β -Diversität durch Antibiotika

Bei der Berechnung der β -Diversität durch MDS war die Trennung der Proben verschiedener Patienten signifikant. Am wenigsten Ähnlichkeit zeigten die Proben des Patienten mit dreifacher Antibiotikatherapie. Es ist bereits aus einer früheren Studie bekannt, dass sich das Mikrobiom verschiedener Personen stärker unterscheidet, als Proben der gleichen Person zu verschiedenen Zeitpunkten (Ley et al. 2006). In der Studie von Ley et al. war das Mikrobiom adipöser Personen während verschiedener Diäten über ein Jahr untersucht worden. Die Stabilität des Mikrobioms wurde in der vorliegenden Studie nur im Fall der dreifachen Antibiotikatherapie erheblich gestört. Die Proben nach Cotrimoxazol zeigten im Vergleich zu den Proben ohne Antibiotikum keine Veränderung der β -Diversität. Nach Penicillin und Ceftriaxon war die β -Diversität zwar verändert, es wurde jedoch keine signifikante Trennung beobachtet. Diese Ergebnisse zeigen, dass nicht alle Formen der Antibiotikatherapie das Gleichgewicht des Mikrobioms stören, sondern dass die Auswirkung auf das Mikrobiom von der eingesetzten Substanz und der Intensität der Therapie abhängt.

5.9.3 Zusammensetzung des Mikrobioms nach Antibiotikagabe

Durch die Antibiotika Ceftriaxon, Azithromycin und Metronidazol war die Zusammensetzung des Mikrobioms 11 Tage nach Beginn der Therapie grundlegend verändert. Der Anteil der Gattungen *Bacteroides* und *Enterococcus* war von < 1 % auf 66 % angestiegen. Gleichzeitig verschwanden jene Gattungen, die zuvor das Mikrobiom gebildet hatten, darunter auch *Bifidobacterium*. Eine Verminderung von *Bifidobacterium* bei gleichzeitigem Anstieg von *Enterococcus* war auch in der Studie von Jakobsson et al. 8-13 Tage nach Antibiotikaeinnahme und in einer früheren Studie mit Kultur-basierten Methoden (Adamsson et al. 1999) beobachtet worden. Bei Jakobsson et al. hatten Patienten mit Clarithromycin und Metronidazol eine ähnliche Therapie wie Patient 07 erhalten. Nach einem Jahr wurde *Enterococcus* nicht mehr nachgewiesen. Auch bei Patient 07 der vorliegenden Studie war die Zunahme von *Enterococcus* nur vorübergehend. Drei Monate nach Antibiotikatherapie war der Anteil auf 0,04 % zurückgegangen. Dass der Anteil von *Enterococcus* auch bei zusätzlicher Gabe von Ceftriaxon anstieg, lässt sich durch die natürliche Resistenz von Enterokokken gegen Cephalosporine erklären (Karow & Lang-Roth 2016). Das breite Spektrum der Antibiotikatherapie, welche durch Metronidazol auch die im Darm vorherrschenden Anaerobier abdeckte, löste einen Selektionsdruck aus, unter dem sich *Enterococcus* vermehren konnte. Obwohl Enterokokken in der Regel harmlos sind und sogar als Probiotika eingesetzt werden, führen multiresistente Stämme von *Enterococcus faecium* immer häufiger zu lebensbedrohlichen Infektionen in Krankenhäusern (Kayser et al. 2014). Vor diesem Hintergrund muss eine Selektion von *Enterococcus* durch Antibiotika kritisch betrachtet werden.

Neben *Enterococcus* war auch der Anteil der Gattung *Bacteroides* deutlich angestiegen. Dies konnte auch im Fall des Patienten mit Ceftriaxon-Monotherapie und in weiteren Studien bei unterschiedlichen Antibiotika beobachtet werden (Perez-Cobas et al. 2013; Panda et al. 2014). *Bacteroides* können β -Lactamasen bilden und damit Cephalosporine und Penicilline abbauen (Suerbaum et al. 2016). Gegen zahlreiche weitere Antibiotika, darunter auch Metronidazol, sind Resistenzmechanismen beschrieben (Suerbaum et al. 2016). In der Folge kann sich diese Gattung bei Selektionsdruck durch Antibiotika gegenüber anderen Gattungen vermehren. Die Gruppe von Jernberg et al. fand zwei Jahre nach Clindamycin-Therapie eine Verminderung der klonalen Diversität von *Bacteroides*

und eine persistierende Erhöhung von Resistenzgenen. In der vorliegenden Studie war *Bacteroides* nach 6-9 Monaten noch deutlich häufiger als vor Antibiotikagabe.

Die Gattung *Bifidobacterium* hatte auch 6 Monate nach Antibiotikatherapie keinen Anteil an der Darmmikrobiota. *Bifidobacterium* trägt durch die Produktion von Acetat dazu bei, dass Bakterien wie *Faecalibacterium prausnitzii* vermehrt Butyrat produzieren (Rios-Covian et al. 2015). Dieser Mechanismus wird als Kreuzfütterung bezeichnet. Butyrat wiederum beeinflusst die Integrität der Darmbarriere (Peng et al. 2007) und hat immunmodulatorische und anti-inflammatorische Eigenschaften (Riviere et al. 2016). Der Verlust von *Bifidobacterium* trägt somit indirekt zur Translokation mikrobieller Produkte in den Kreislauf und zur systemischen Entzündung bei (Dillon et al. 2017) und muss als unerwünschte Folge der Antibiotikatherapie gewertet werden.

5.9.4 Häufigkeit einzelner Gattungen

Beim Vergleich von Proben direkt nach Penicillintherapie mit Proben der gleichen Patienten zu einem späteren Zeitpunkt war die Häufigkeit der Prevotellaceae nach 6-9 Monaten bei 3 von 4 Patienten deutlich angestiegen. Bei einem Patienten wurde die Familie nach dem gleichen Zeitraum nicht mehr nachgewiesen. In einer aktuellen Studie (Nowak et al. 2017) war der Anteil von *Prevotella* in der ART-positiven Kohorte niedriger als bei unbehandelten Patienten mit HIV. Dies wurde auf die Ursache zurückgeführt, dass mehrere der unbehandelten Patienten von einer rektalen Gonorrhoe betroffen waren. In dieser Gruppe war der Anteil von *Prevotella* besonders hoch. Auch wenn die zeitlichen Abstände zwischen Infektion, möglicher Therapie und Abgabe der Stuhlprobe nicht bekannt sind, ist ein Zusammenhang mit einer Antibiotikatherapie denkbar.

In einer Vielzahl von Studien wurden bei HIV-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen Veränderungen in der Häufigkeit bestimmter Familien und Gattungen beschrieben. Die Gruppe von Dubourg et al. fand zudem bei HIV-Patienten eine Abnahme des Anteils obligat anaerober Bakterien wie *Bifidobacterium* und eine Zunahme aerotoleranter Bakterien wie *Enterococcus*.

Insbesondere die Zunahme von *Prevotella* bei gleichzeitig verminderten *Bacteroides* wurde in mehreren Studien nachgewiesen (Lozupone et al. 2013; Dillon et al. 2014; Mutlu et al. 2014; Vazquez-Castellanos et al. 2015; Ling et al. 2016). Jedoch hatte die einzige

Studie mit MSM als HIV-negative Kontrollen kein vermehrtes Vorkommen von *Prevotella* bei HIV-Patienten gezeigt (Vujkovic-Cvijin et al. 2013). In einer weiteren Studie war der Anteil von *Prevotella* vor ART-Beginn nicht größer als bei HIV-negativen Kontrollen und nahm unter ART weiter ab (Nowak et al. 2015).

Die gleichen Gattungen, die in bisherigen Studien bei HIV-Infektion verändert waren, wurden in der vorliegenden Studie stark durch Antibiotika beeinflusst. Insbesondere die Häufigkeit der Gattungen *Prevotella*, *Bifidobacterium* und *Bacteroides* war 6-9 Monate nach Antibiotikatherapie noch deutlich verändert. Auch Artenzahl und α -Diversität waren zu diesem Zeitpunkt nicht wiederhergestellt. Eine kürzlich erfolgte Antibiotikatherapie stellte zwar in den bisherigen Studien ein Ausschlusskriterium dar, jedoch nur wenn diese innerhalb der letzten 3 Monate erfolgt war (Dillon et al. 2014; Vazquez-Castellanos et al. 2015; Dubourg et al. 2016). In der Studie von Ling et al. wurden Patienten mit einer Antibiotikatherapie innerhalb eines Monats vor Studienbeginn ausgeschlossen.

Neben AIDS-assoziierten Erkrankungen sind bakterielle Infektionen bei Menschen mit HIV der häufigste Grund für Krankenhausaufenthalte und ein wichtiger Faktor für die Mortalität (Ford et al. 2015). Vor dem Hintergrund, dass Patienten mit HIV im Vergleich zu HIV-negativen Kontrollen ein höheres Risiko für bakteriellen Infektionen und für eine Exposition gegenüber Antibiotika haben, sollten Unterschiede des Mikrobioms zwischen HIV-positiven und HIV-negativen Menschen besonders kritisch bewertet werden. Es lässt sich nur schwer ausschließen, dass solche Unterschiede durch eine Antibiotikatherapie mitverursacht wurden, selbst wenn diese schon länger zurückliegt.

5.10 Ausblick

In Zukunft wird die Frage nach spezifischen Veränderungen des Darmmikrobioms bei HIV-Patienten in groß angelegten Studien weiter untersucht werden. Dabei wird vor allem die Kontrolle von Einflussfaktoren wie sexuelle Präferenz, Ernährung, chronische Erkrankungen und Medikamente eine große Herausforderung darstellen. Selbst wenn die Dysbiose bei HIV nicht primär durch die Infektion verursacht sein sollte, sondern vielmehr gleichzeitig auftritt, stellt sich die Frage wie die Integrität der Mikrobiota wiederhergestellt werden kann. Die Einnahme von Probiotika (Stiksrud et al. 2015; Villar-Garcia et al. 2015; d'Ettorre et al. 2015), Präbiotika (Gori et al. 2011) und beidem

in Kombination (Gonzalez-Hernandez et al. 2012) konnte bereits in Studien die Inflammation unter ART verringern. Auch die Stuhltransplantation, die bereits an SIV-infizierten Affen durchgeführt wurde (Hensley-McBain et al. 2016), wird man in diesem Zusammenhang diskutieren. Sie wird jedoch aller Voraussicht nach Einzelfällen vorbehalten bleiben.

Neben dem Darmmikrobiom stellt insbesondere das Mikrobiom der Haut ein bedeutendes und bisher wenig erforschtes Interessensgebiet dar. Hautprobleme betreffen mehr als 90 % der Menschen mit HIV und treten im gesamten Verlauf der HIV-Infektion auf (Suttorp et al. 2016). Neben opportunistischen Infektionen und Neoplasien haben auch die seborrhoische Dermatitis und die Follikulitis eine höhere Prävalenz als in der HIV-negativen Bevölkerung (Suttorp et al. 2016). Hier könnte die Untersuchung des Hautmikrobioms Hinweise auf spezifische Veränderungen liefern.

6 Zusammenfassung

Der Übertritt mikrobieller Produkte aus dem Darm in den systemischen Kreislauf und die dadurch bedingte Immunaktivierung werden bei HIV-Patienten als eine der Ursachen der auch unter ART erhöhten Morbidität angesehen. Mehrere Studien fanden bereits Unterschiede des Darmmikrobioms zwischen HIV-positiven und HIV-negativen Menschen. Das Ziel der vorliegenden Studie war daher, das Darmmikrobiom bei HIV-Patienten im Zeitverlauf vor und nach ART-Beginn zu untersuchen und den Zusammenhang mit klinischen Einflussfaktoren zu beurteilen.

Hierfür wurden Stuhlproben HIV-positiver, therapienaiver Patienten kurz vor Beginn der ART sowie nach 3, 6 und 9 Monaten genommen. Gleichzeitig wurden die klinischen Daten der Patienten erfasst. Das Mikrobiom wurde durch Sequenzierung der V3/V4-Region des 16S-rRNA-Gens in einem MiSeq-System (Illumina) analysiert.

Es wurde beobachtet, dass das ART-Regime die Häufigkeit der Ruminococcaceae beeinflusst. Den stärksten Effekt auf das Mikrobiom hatten jedoch Antibiotika. Während die effektive Artenzahl (Shannon) nach dreifacher antibiotischer Therapie erheblich abgesunken war, zeigte sich nach Penicillin die Tendenz zu einer größeren α -Diversität als ohne Antibiotika. Auch die Häufigkeit einzelner Gattungen wurde langfristig verändert.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass das Mikrobiom bei HIV-Patienten durch Antibiotika langfristig beeinflusst wurde und der Effekt maßgeblich von den eingesetzten Substanzen abhing. Um zu beurteilen, welche weiteren Faktoren relevante Veränderungen des Mikrobioms verursachen, werden weiterführende Studien mit größeren Fallzahlen benötigt.

7 Abstract

Background: Microbial Translocation and resulting immune activation are considered major causes of increased morbidity in HIV patients despite ART. Several studies described differences between the gut microbiome of HIV-positive and HIV-negative people.

Objective: The aim of our study was to evaluate the gut microbiome of HIV-positive patients over a period of time before and after initiation of ART and to analyze correlation with clinical parameters.

Methods: In this pilot study we collected stool samples from HIV-positive, treatment-naive patients shortly before ART-initiation and 3, 6 and 9 months later. At the same time we gathered clinical information for all patients. The microbiome was analyzed by sequencing the V3/V4 region of 16S rRNA genes in a MiSeq system (Illumina).

Results: We found that the type of ART influenced the frequency of the family Ruminococcaceae. However, the strongest effect on the microbiome was caused by antibiotics. While the Shannon effective was reduced significantly after triple therapy, samples after Penicillin showed a trend towards greater diversity than samples without antibiotics. Another effect was the long-term shift in the frequency of specific genera.

Conclusion: These results indicate a long-term effect of antibiotics on the human gut microbiome which depended on the type of antibiotic substance. To evaluate other parameters that cause relevant changes of the microbiota in HIV-positive patients, further studies with more patients are necessary.

Literaturverzeichnis

- Adamsson, I., Nord, C.E., Lundquist, P., Sjostedt, S., Edlund, C. (1999). Comparative effects of omeprazole, amoxicillin plus metronidazole versus omeprazole, clarithromycin plus metronidazole on the oral, gastric and intestinal microflora in *Helicobacter pylori*-infected patients. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 44 (5), 629–640.
- Ancuta, P., Kamat, A., Kunstman, K.J., Kim, E.-Y., Autissier, P., Wurcel, A., Zaman, T., Stone, D., Mefford, M., Morgello, S., Singer, E.J., Wolinsky, S.M., Gabuzda, D. (2008). Microbial translocation is associated with increased monocyte activation and dementia in AIDS patients. *PloS one*, 3 (6), e2516.
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D.R., Fernandes, G.R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J.-M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M., Kurokawa, K., Leclerc, M., Levenez, F., Manichanh, C., Nielsen, H.B., Nielsen, T., Pons, N., Poulain, J., Qin, J., Sicheritz-Ponten, T., Tims, S., Torrents, D., Ugarte, E., Zoetendal, E.G., Wang, J., Guarner, F., Pedersen, O., Vos, W.M. de, Brunak, S., Dore, J., Antolin, M., Artiguenave, F., Blottiere, H.M., Almeida, M., Brechot, C., Cara, C., Chervaux, C., Cultrone, A., Delorme, C., Denariáz, G., Dervyn, R., Foerstner, K.U., Friss, C., van de Guchte, M., Guedon, E., Haimet, F., Huber, W., van Hylckama-Vlieg, J., Jamet, A., Juste, C., Kaci, G., Knol, J., Lakhdari, O., Layec, S., Le Roux, K., Maguin, E., Merieux, A., Melo Minardi, R., M'rini, C., Muller, J., Oozeer, R., Parkhill, J., Renault, P., Rescigno, M., Sanchez, N., Sunagawa, S., Torrejon, A., Turner, K., Vandemeulebrouck, G., Varela, E., Winogradsky, Y., Zeller, G., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D., Bork, P. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473 (7346), 174–180.
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 220 (4599), 868–871.

-
- Berry, D., Ben Mahfoudh, K., Wagner, M., Loy, A. (2011). Barcoded primers used in multiplex amplicon pyrosequencing bias amplification. *Applied and environmental microbiology*, 77 (21), 7846–7849.
- Brenchley, J.M., Paiardini, M., Knox, K.S., Asher, A.I., Cervasi, B., Asher, T.E., Scheinberg, P., Price, D.A., Hage, C.A., Kholi, L.M., Khoruts, A., Frank, I., Else, J., Schacker, T., Silvestri, G., Douek, D.C. (2008). Differential Th17 CD4 T-cell depletion in pathogenic and nonpathogenic lentiviral infections. *Blood*, 112 (7), 2826–2835.
- Brenchley, J.M., Price, D.A., Schacker, T.W., Asher, T.E., Silvestri, G., Rao, S., Kazzaz, Z., Bornstein, E., Lambotte, O., Altmann, D., Blazar, B.R., Rodriguez, B., Teixeira-Johnson, L., Landay, A., Martin, J.N., Hecht, F.M., Picker, L.J., Lederman, M.M., Deeks, S.G., Douek, D.C. (2006). Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nature medicine*, 12 (12), 1365–1371.
- Brenchley, J.M., Schacker, T.W., Ruff, L.E., Price, D.A., Taylor, J.H., Beilman, G.J., Nguyen, P.L., Khoruts, A., Larson, M., Haase, A.T., Douek, D.C. (2004). CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *The Journal of experimental medicine*, 200 (6), 749–759.
- Cain, L.E., Logan, R., Robins, J.M., Sterne, J.A.C., Sabin, C., Bansi, L., Justice, A., Goulet, J., van Sighem, A., de Wolf, F., Bucher, H.C., von Wyl, V., Esteve, A., Casabona, J., del Amo, J., Moreno, S., Seng, R., Meyer, L., Perez-Hoyos, S., Muga, R., Lodi, S., Lanoy, E., Costagliola, D., Hernan, M.A. (2011). When to initiate combined antiretroviral therapy to reduce mortality and AIDS-defining illness in HIV-infected persons in developed countries: an observational study. *Annals of internal medicine*, 154 (8), 509–515.
- Carr, A., Samaras, K., Burton, S., Law, M., Freund, J., Chisholm, D.J., Cooper, D.A. (1998). A syndrome of peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia and insulin resistance in patients receiving HIV protease inhibitors. *AIDS*, 12 (7), F51-8.
- Castellarin, M., Warren, R.L., Freeman, J.D., Dreolini, L., Krzywinski, M., Strauss, J., Barnes, R., Watson, P., Allen-Vercoe, E., Moore, R.A., Holt, R.A. (2012). *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome research*, 22 (2), 299–306.
- Centers for Disease Control. (1982). Update on acquired immune deficiency syndrome (AIDS)--United States. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 31 (37), 507-508, 513-514.

- Chen, J., Bittinger, K., Charlson, E.S., Hoffmann, C., Lewis, J., Wu, G.D., Collman, R.G., Bushman, F.D., Li, H. (2012). Associating microbiome composition with environmental covariates using generalized UniFrac distances. *Bioinformatics*, 28 (16), 2106–2113.
- Cho, I., Blaser, M.J. (2012). The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nature reviews. Genetics*, 13 (4), 260–270.
- Cicconi, P., Cozzi-Lepri, A., Castagna, A., Trescarichi, E.M., Antinori, A., Gatti, F., Cassola, G., Sighinolfi, L., Castelli, P., d'Arminio Monforte, A. (2010). Insights into reasons for discontinuation according to year of starting first regimen of highly active antiretroviral therapy in a cohort of antiretroviral-naive patients. *HIV medicine*, 11 (2), 104–113.
- Clarke, T.B., Davis, K.M., Lysenko, E.S., Zhou, A.Y., Yu, Y., Weiser, J.N. (2010). Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity. *Nature medicine*, 16 (2), 228–231.
- Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, F., Chamaret, S., Rey, M.A., Santos-Ferreira, M.O., Laurent, A.G., Dauguet, C., Katlama, C., Rouzioux, C. (1986). Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science*, 233 (4761), 343–346.
- Clumeck, N., Mascart-Lemone, F., de Maubeuge, J., Brenez, D., Marcelis, L. (1983). Acquired immune deficiency syndrome in Black Africans. *Lancet*, 1 (8325), 642.
- Curran, J.W., Lawrence, D.N., Jaffe, H., Kaplan, J.E., Zyla, L.D., Chamberland, M., Weinstein, R., Lui, K.J., Schonberger, L.B., Spira, T.J. (1984). Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) associated with transfusions. *The New England journal of medicine*, 310 (2), 69–75.
- Davis, K.C., Horsburgh, C.R. JR, Hasiba, U., Schocket, A.L., Kirkpatrick, C.H. (1983). Acquired immunodeficiency syndrome in a patient with hemophilia. *Annals of internal medicine*, 98 (3), 284–286.
- Dethlefsen, L., Huse, S., Sogin, M.L., Relman, D.A. (2008). The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS biology*, 6 (11), e280.
- Dethlefsen, L., Relman, D.A. (2011). Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 Suppl 1, 4554–4561.

-
- d'Ettorre, G., Ceccarelli, G., Giustini, N., Serafino, S., Calantone, N., de Girolamo, G., Bianchi, L., Bellelli, V., Ascoli-Bartoli, T., Marcellini, S., Turriziani, O., Brenchley, J.M., Vullo, V. (2015). Probiotics Reduce Inflammation in Antiretroviral Treated, HIV-Infected Individuals: Results of the "Probio-HIV" Clinical Trial. *PloS one*, 10 (9), e0137200.
- Deutsche AIDS-Gesellschaft (DAIG). (2015). *Deutsch-Österreichische Leitlinien zur antiretroviralen Therapie der HIV-Infektion*. AWMF-Register-Nr.: 055-001. Version 6.
- Dillon, S.M., Kibbie, J., Lee, E.J., Guo, K., Santiago, M.L., Austin, G.L., Gianella, S., Landay, A.L., Donovan, A.M., Frank, D.N., McCarter, M.D., Wilson, C.C. (2017). Low abundance of colonic butyrate-producing bacteria in HIV infection is associated with microbial translocation and immune activation. *AIDS*, 31 (4), 511–521.
- Dillon, S.M., Lee, E.J., Kotter, C.V., Austin, G.L., Dong, Z., Hecht, D.K., Gianella, S., Siewe, B., Smith, D.M., Landay, A.L., Robertson, C.E., Frank, D.N., Wilson, C.C. (2014). An altered intestinal mucosal microbiome in HIV-1 infection is associated with mucosal and systemic immune activation and endotoxemia. *Mucosal immunology*, 7 (4), 983–994.
- Dinh, D.M., Volpe, G.E., Duffalo, C., Bhalchandra, S., Tai, A.K., Kane, A.V., Wanke, C.A., Ward, H.D. (2015). Intestinal microbiota, microbial translocation, and systemic inflammation in chronic HIV infection. *The Journal of infectious diseases*, 211 (1), 19–27.
- Doerr, H.W., Gerlich, W.H. (Hg.). (2010). *Medizinische Virologie: Grundlagen, Diagnostik, Prävention und Therapie viraler Erkrankungen*. 2. Auflage. Stuttgart: Thieme.
- Dubourg, G., Lagier, J.-C., Hue, S., Surenaud, M., Bachar, D., Robert, C., Michelle, C., Ravaux, I., Mokhtari, S., Million, M., Stein, A., Brouqui, P., Levy, Y., Raoult, D. (2016). Gut microbiota associated with HIV infection is significantly enriched in bacteria tolerant to oxygen. *BMJ open gastroenterology*, 3 (1), e000080.
- Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E., Ravel, D.A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 308 (5728), 1635–1638.
- Edgar, R.C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, 32 (5), 1792–1797.

- Edgar, R.C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26 (19), 2460–2461.
- Edgar, R.C. (2013). UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature methods*, 10 (10), 996–998.
- Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C., Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 27 (16), 2194–2200.
- Elliott, J.L., Hoppes, W.L., Platt, M.S., Thomas, J.G., Patel, I.P., Gansar, A. (1983). The acquired immunodeficiency syndrome and Mycobacterium avium-intracellulare bacteremia in a patient with hemophilia. *Annals of internal medicine*, 98 (3), 290–293.
- Ellis, C.L., Ma, Z.-M., Mann, S.K., Li, C.-S., Wu, J., Knight, T.H., Yotter, T., Hayes, T.L., Maniar, A.H., Troia-Cancio, P.V., Overman, H.A., Torok, N.J., Albanese, A., Rutledge, J.C., Miller, C.J., Pollard, R.B., Asmuth, D.M. (2011). Molecular characterization of stool microbiota in HIV-infected subjects by panbacterial and order-level 16S ribosomal DNA (rDNA) quantification and correlations with immune activation. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*, 57 (5), 363–370.
- Engels, E.A., Biggar, R.J., Hall, H.I., Cross, H., Crutchfield, A., Finch, J.L., Grigg, R., Hylton, T., Pawlish, K.S., McNeel, T.S., Goedert, J.J. (2008). Cancer risk in people infected with human immunodeficiency virus in the United States. *International journal of cancer*, 123 (1), 187–194.
- Essex, M., McLane, M.F., Lee, T.H., Falk, L., Howe, C.W., Mullins, J.I., Cabradilla, C., Francis, D.P. (1983a). Antibodies to cell membrane antigens associated with human T-cell leukemia virus in patients with AIDS. *Science*, 220 (4599), 859–862.
- Essex, M., McLane, M.F., Lee, T.H., Tachibana, N., Mullins, J.I., Kreiss, J., Kasper, C.K., Poon, M.C., Landay, A., Stein, S.F., Francis, D.P., Cabradilla, C., Lawrence, D.N., Evatt, B.L. (1983b). Antibodies to human T-cell leukemia virus membrane antigens (HTLV-MA) in hemophiliacs. *Science*, 221 (4615), 1061–1064.
- Estes, J.D., Harris, L.D., Klatt, N.R., Tabb, B., Pittaluga, S., Paiardini, M., Barclay, G.R., Smedley, J., Pung, R., Oliveira, K.M., Hirsch, V.M., Silvestri, G., Douek, D.C., Miller, C.J., Haase, A.T., Lifson, J., Brenchley, J.M. (2010). Damaged intestinal epithelial integrity linked to microbial translocation in pathogenic simian immunodeficiency virus infections. *PLoS pathogens*, 6 (8), e1001052.

-
- Ford, N., Shubber, Z., Meintjes, G., Grinsztejn, B., Eholie, S., Mills, E.J., Davies, M.-A., Vitoria, M., Penazzato, M., Nsanzimana, S., Frigati, L., O'Brien, D., Ellman, T., Ajose, O., Calmy, A., Doherty, M. (2015). Causes of hospital admission among people living with HIV worldwide: A systematic review and meta-analysis. *The Lancet HIV*, 2 (10), e438-e444.
- Frank, D.N., St Amand, A.L., Feldman, R.A., Boedeker, E.C., Harpaz, N., Pace, N.R. (2007). Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104 (34), 13780–13785.
- Freiberg, M.S., Chang, C.-C.H., Kuller, L.H., Skanderson, M., Lowy, E., Kraemer, K.L., Butt, A.A., Bidwell Goetz, M., Leaf, D., Oursler, K.A., Rimland, D., Rodriguez Barradas, M., Brown, S., Gibert, C., McGinnis, K., Crothers, K., Sico, J., Crane, H., Warner, A., Gottlieb, S., Gottdiener, J., Tracy, R.P., Budoff, M., Watson, C., Armah, K.A., Doebler, D., Bryant, K., Justice, A.C. (2013). HIV infection and the risk of acute myocardial infarction. *JAMA internal medicine*, 173 (8), 614–622.
- Galli, M., Ridolfo, A.L., Adorni, F., Gervasoni, C., Ravasio, L., Corsico, L., Gianelli, E., Piazza, M., Vaccarezza, M., d'Arminio Monforte, A., Moroni, M. (2002). Body habitus changes and metabolic alterations in protease inhibitor-naive HIV-1-infected patients treated with two nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 29 (1), 21–31.
- Gallo, R.C., Sarin, P.S., Gelmann, E.P., Robert-Guroff, M., Richardson, E., Kalyanaraman, V.S., Mann, D., Sidhu, G.D., Stahl, R.E., Zolla-Pazner, S., Leibowitch, J., Popovic, M. (1983). Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 220 (4599), 865–867.
- Gao, F., Bailes, E., Robertson, D.L., Chen, Y., Rodenburg, C.M., Michael, S.F., Cummins, L.B., Arthur, L.O., Peeters, M., Shaw, G.M., Sharp, P.M., Hahn, B.H. (1999). Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes*. *Nature*, 397 (6718), 436–441.
- Geuking, M.B., Koller, Y., Rupp, S., McCoy, K.D. (2014). The interplay between the gut microbiota and the immune system. *Gut microbes*, 5 (3), 411–418.
- Gilead Sciences Ireland UC. (2018). Fachinformation Truvada 200 mg/245 mg Filmtabletten. Zulassungsnummer EU/1/04/305/001. URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/truvada-epar-product-information_de.pdf (Aufruf am 14.07.2019).

- Giorgi, J.V., Hultin, L.E., McKeating, J.A., Johnson, T.D., Owens, B., Jacobson, L.P., Shih, R., Lewis, J., Wiley, D.J., Phair, J.P., Wolinsky, S.M., Detels, R. (1999). Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *The Journal of infectious diseases*, 179 (4), 859–870.
- Gonzalez-Hernandez, L.A., Jave-Suarez, L.F., Fafutis-Morris, M., Montes-Salcedo, K.E., Valle-Gutierrez, L.G., Campos-Loza, A.E., Enciso-Gomez, L.F., Andrade-Villanueva, J.F. (2012). Synbiotic therapy decreases microbial translocation and inflammation and improves immunological status in HIV-infected patients: a double-blind randomized controlled pilot trial. *Nutrition journal*, 11, 90.
- Gori, A., Rizzardini, G., Van't Land, B., Amor, K.B., van Schaik, J., Torti, C., Quirino, T., Tincati, C., Bandera, A., Knol, J., Benhassan-Chahour, K., Trabattoni, D., Bray, D., Vriesema, A., Welling, G., Garssen, J., Clerici, M. (2011). Specific prebiotics modulate gut microbiota and immune activation in HAART-naïve HIV-infected adults: results of the "COPA" pilot randomized trial. *Mucosal immunology*, 4 (5), 554–563.
- Gori, A., Tincati, C., Rizzardini, G., Torti, C., Quirino, T., Haarman, M., Ben Amor, K., van Schaik, J., Vriesema, A., Knol, J., Marchetti, G., Welling, G., Clerici, M. (2008). Early impairment of gut function and gut flora supporting a role for alteration of gastrointestinal mucosa in human immunodeficiency virus pathogenesis. *Journal of clinical microbiology*, 46 (2), 757–758.
- Gottlieb, M.S., Schroff, R., Schanker, H.M., Weisman, J.D., Fan, P.T., Wolf, R.A., Saxon, A. (1981). Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *The New England journal of medicine*, 305 (24), 1425–1431.
- Grabar, S., Kousignian, I., Sobel, A., Le Bras, P., Gasnault, J., Enel, P., Jung, C., Mahamat, A., Lang, J.-M., Costagliola, D. (2004). Immunologic and clinical responses to highly active antiretroviral therapy over 50 years of age. Results from the French Hospital Database on HIV. *AIDS*, 18 (15), 2029–2038.
- Grivennikov, S.I., Karin, M. (2011). Inflammatory cytokines in cancer: tumour necrosis factor and interleukin 6 take the stage. *Annals of the rheumatic diseases*, 70, i104–i108.
- Guadalupe, M., Reay, E., Sankaran, S., Prindiville, T., Flamm, J., McNeil, A., Dandekar, S. (2003). Severe CD4+ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human

-
- immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy. *Journal of virology*, 77 (21), 11708–11717.
- Hahn, B.H. (2000). AIDS as a Zoonosis: Scientific and Public Health Implications. *Science*, 287 (5453), 607–614.
- Haller, D., Hörmannspenger, G. (2015). *Darmgesundheit und Mikrobiota*. Wiesbaden: Springer Fachmedien Wiesbaden.
- Hansson, G.K., Hermansson, A. (2011). The immune system in atherosclerosis. *Nature immunology*, 12 (3), 204–212.
- Hazenberg, M.D., Stuart, James W. T. Cohen, Otto, S.A., Borleffs, J.C.C., Boucher, C.A.B., Boer, R.J.d., Miedema, F., Hamann, D. (2000). T-cell division in human immunodeficiency virus (HIV)-1 infection is mainly due to immune activation: a longitudinal analysis in patients before and during highly active antiretroviral therapy (HAART). *Blood*, 95 (1), 249–255.
- Hellerstein, M., Hanley, M.B., Cesar, D., Siler, S., Papageorgopoulos, C., Wieder, E., Schmidt, D., Hoh, R., Neese, R., Macallan, D., Deeks, S., McCune, J.M. (1999). Directly measured kinetics of circulating T lymphocytes in normal and HIV-1-infected humans. *Nature medicine*, 5 (1), 83–89.
- Hensley-McBain, T., Zevin, A.S., Manuzak, J., Smith, E., Gile, J., Miller, C., Agricola, B., Katze, M., Reeves, R.K., Kraft, C.S., Langevin, S., Klatt, N.R. (2016). Effects of Fecal Microbial Transplantation on Microbiome and Immunity in Simian Immunodeficiency Virus-Infected Macaques. *Journal of virology*, 90 (10), 4981–4989.
- Herold, G. (2016). *Innere Medizin 2017*. Köln: Herold, Gerd.
- Hoffmann, C., Rockstroh, J.K. (2016). *HIV 2016/17*. Hamburg: Medizin Fokus Verlag.
- Jaffe, H.W., Francis, D.P., McLane, M.F., Cabradilla, C., Curran, J.W., Kilbourne, B.W., Lawrence, D.N., Haverkos, H.W., Spira, T.J., Dodd, R.Y. (1984). Transfusion-associated AIDS: serologic evidence of human T-cell leukemia virus infection of donors. *Science*, 223 (4642), 1309–1312.
- Jakobsson, H.E., Jernberg, C., Andersson, A.F., Sjolund-Karlsson, M., Jansson, J.K., Engstrand, L. (2010). Short-term antibiotic treatment has differing long-term impacts on the human throat and gut microbiome. *PloS one*, 5 (3), e9836.
- Jethwa, H., Abraham, S. (2016). The evidence for microbiome manipulation in inflammatory arthritis. *Rheumatology*, 56 (9), 1452–1460.

- Jiang, W., Lederman, M.M., Hunt, P., Sieg, S.F., Haley, K., Rodriguez, B., Landay, A., Martin, J., Sinclair, E., Asher, A.I., Deeks, S.G., Douek, D.C., Brenchley, J.M. (2009). Plasma levels of bacterial DNA correlate with immune activation and the magnitude of immune restoration in persons with antiretroviral-treated HIV infection. *The Journal of infectious diseases*, 199 (8), 1177–1185.
- Johansson, M.E.V., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., Hansson, G.C. (2008). The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105 (39), 15064–15069.
- Jost, L. (2007). Partitioning diversity into independent alpha and beta components. *Ecology*, 88 (10), 2427–2439.
- Karow, T., Lang-Roth, R. (2016). *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie 2017*. 25. Auflage. Pulheim: Thomas Karow.
- Kaufmann, G.R., Bloch, M., Zaunders, J.J., Smith, D., Cooper, D.A. (2000). Long-term immunological response in HIV-1-infected subjects receiving potent antiretroviral therapy. *AIDS*, 14 (8), 959–969.
- Kaufmann, G.R., Perrin, L., Pantaleo, G., Opravil, M., Furrer, H., Telenti, A., Hirschel, B., Ledergerber, B., Vernazza, P., Bernasconi, E., Rickenbach, M., Egger, M., Battegay, M. (2003). CD4 T-lymphocyte recovery in individuals with advanced HIV-1 infection receiving potent antiretroviral therapy for 4 years: the Swiss HIV Cohort Study. *Archives of internal medicine*, 163 (18), 2187–2195.
- Kayser, F.H., Böttger, E.C., Deplazes, P., Haller, O., Roers, A. (2014). *Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie*. 13. Auflage. Stuttgart: Thieme.
- Kelesidis, T., Kendall, M.A., Yang, O.O., Hodis, H.N., Currier, J.S. (2012). Biomarkers of microbial translocation and macrophage activation: association with progression of subclinical atherosclerosis in HIV-1 infection. *The Journal of infectious diseases*, 206 (10), 1558–1567.
- Klatt, N.R., Estes, J.D., Sun, X., Ortiz, A.M., Barber, J.S., Harris, L.D., Cervasi, B., Yokomizo, L.K., Pan, L., Vinton, C.L., Tabb, B., Canary, L.A., Dang, Q., Hirsch, V.M., Alter, G., Belkaid, Y., Lifson, J.D., Silvestri, G., Milner, J.D., Paiardini, M., Haddad, E.K., Brenchley, J.M. (2012). Loss of mucosal CD103+ DCs and IL-17+ and IL-22+ lymphocytes is associated with mucosal damage in SIV infection. *Mucosal immunology*, 5 (6), 646–657.

-
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glockner, F.O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic acids research*, 41 (1), e1.
- Knipe, D.M., Howley, P.M. (Hg.). (2013). *Fields Virology*. 6. Auflage. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.
- Kostic, A.D., Gevers, D., Pedamallu, C.S., Michaud, M., Duke, F., Earl, A.M., Ojesina, A.I., Jung, J., Bass, A.J., Taberero, J., Baselga, J., Liu, C., Shivdasani, R.A., Ogino, S., Birren, B.W., Huttenhower, C., Garrett, W.S., Meyerson, M. (2012). Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome research*, 22 (2), 292–298.
- Kotler, D.P., Gaetz, H.P., Lange, M., Klein, E.B., Holt, P.R. (1984). Enteropathy associated with the acquired immunodeficiency syndrome. *Annals of internal medicine*, 101 (4), 421–428.
- Kuczynski, J., Lauber, C.L., Walters, W.A., Parfrey, L.W., Clemente, J.C., Gevers, D., Knight, R. (2012). Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. *Nature reviews. Genetics*, 13 (1), 47–58.
- Kunkel-Razum, K., Billes, S., Pellengahr, C. (Hg.). (2015). *Duden - das Fremdwörterbuch*. 11. Auflage. Berlin: Dudenverlag.
- Lagkouvardos, I., Fischer, S., Kumar, N., Clavel, T. (2017). Rhea: a transparent and modular R pipeline for microbial profiling based on 16S rRNA gene amplicons. *PeerJ*, 5, e2836.
- Lagkouvardos, I., Joseph, D., Kapfhammer, M., Giritli, S., Horn, M., Haller, D., Clavel, T. (2016). IMNGS: A comprehensive open resource of processed 16S rRNA microbial profiles for ecology and diversity studies. *Scientific reports*, 6, 33721.
- Le Moing, V., Thiebaut, R., Chene, G., Leport, C., Cailleton, V., Michelet, C., Fleury, H., Herson, S., Raffi, F. (2002). Predictors of long-term increase in CD4+ cell counts in human immunodeficiency virus-infected patients receiving a protease inhibitor-containing antiretroviral regimen. *The Journal of infectious diseases*, 185 (4), 471–480.
- Lederberg, J., McCray, A.T. (2001). `Ome Sweet `Omics--A Genealogical Treasury of Words. *The Scientist*, 15 (7), 8.

- Ley, R.E., Backhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C.A., Knight, R.D., Gordon, J.I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (31), 11070–11075.
- Ley, R.E., Turnbaugh, P.J., Klein, S., Gordon, J.I. (2006). Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 444 (7122), 1022–1023.
- Lien, E., Aukrust, P., Sundan, A., Muller, F., Froland, S.S., Espevik, T. (1998). Elevated levels of serum-soluble CD14 in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection: correlation to disease progression and clinical events. *Blood*, 92 (6), 2084–2092.
- Ling, Z., Jin, C., Xie, T., Cheng, Y., Li, L., Wu, N. (2016). Alterations in the Fecal Microbiota of Patients with HIV-1 Infection: An Observational Study in A Chinese Population. *Scientific reports*, 6, 30673.
- Lopez-Siles, M., Martinez-Medina, M., Suris-Valls, R., Aldeguer, X., Sabat-Mir, M., Duncan, S.H., Flint, H.J., Garcia-Gil, L.J. (2016). Changes in the Abundance of *Faecalibacterium prausnitzii* Phylogroups I and II in the Intestinal Mucosa of Inflammatory Bowel Disease and Patients with Colorectal Cancer. *Inflammatory bowel diseases*, 22 (1), 28–41.
- Lozupone, C.A., Li, M., Campbell, T.B., Flores, S.C., Linderman, D., Gebert, M.J., Knight, R., Fontenot, A.P., Palmer, B.E. (2013). Alterations in the gut microbiota associated with HIV-1 infection. *Cell host & microbe*, 14 (3), 329–339.
- Lüllmann-Rauch, R., Asan, E. (2015). *Histologie*. 5., vollständig überarbeitete Auflage.
- Lundgren, J.D., Babiker, A.G., Gordin, F., Emery, S., Grund, B., Sharma, S., Avihingsanon, A., Cooper, D.A., Fatkenheuer, G., Llibre, J.M., Molina, J.-M., Munderi, P., Schechter, M., Wood, R., Klingman, K.L., Collins, S., Lane, H.C., Phillips, A.N., Neaton, J.D. (2015). Initiation of Antiretroviral Therapy in Early Asymptomatic HIV Infection. *The New England journal of medicine*, 373 (9), 795–807.
- Lyons, J.L., Uno, H., Ancuta, P., Kamat, A., Moore, D.J., Singer, E.J., Morgello, S., Gabuzda, D. (2011). Plasma sCD14 is a biomarker associated with impaired neurocognitive test performance in attention and learning domains in HIV infection. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 57 (5), 371–379.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Stahl, D.A., Clark, D.P. (2013). *Brock Mikrobiologie*. 13. Auflage. München: Pearson Studium.

-
- Manichanh, C., Rigottier-Gois, L., Bonnaud, E., Gloux, K., Pelletier, E., Frangeul, L., Nalin, R., Jarrin, C., Chardon, P., Marteau, P., Roca, J., Dore, J. (2006). Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut*, 55 (2), 205–211.
- Masur, H., Michelis, M.A., Greene, J.B., Onorato, I., Stouwe, R.A., Holzman, R.S., Wormser, G., Brettman, L., Lange, M., Murray, H.W., Cunningham-Rundles, S. (1981). An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. *The New England journal of medicine*, 305 (24), 1431–1438.
- Mattapallil, J.J., Douek, D.C., Hill, B., Nishimura, Y., Martin, M., Roederer, M. (2005). Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature*, 434 (7037), 1093–1097.
- McHardy, I.H., Li, X., Tong, M., Ruegger, P., Jacobs, J., Borneman, J., Anton, P., Braun, J. (2013). HIV Infection is associated with compositional and functional shifts in the rectal mucosal microbiota. *Microbiome*, 1 (1), 26.
- Mehandru, S., Poles, M.A., Tenner-Racz, K., Horowitz, A., Hurley, A., Hogan, C., Boden, D., Racz, P., Markowitz, M. (2004). Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *The Journal of experimental medicine*, 200 (6), 761–770.
- Monaco, C.L., Gootenberg, D.B., Zhao, G., Handley, S.A., Ghebremichael, M.S., Lim, E.S., Lankowski, A., Baldrige, M.T., Wilen, C.B., Flagg, M., Norman, J.M., Keller, B.C., Luevano, J.M., Wang, D., Boum, Y., Martin, J.N., Hunt, P.W., Bangsberg, D.R., Siedner, M.J., Kwon, D.S., Virgin, H.W. (2016). Altered Virome and Bacterial Microbiome in Human Immunodeficiency Virus-Associated Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Cell host & microbe*, 19 (3), 311–322.
- Moore, R.D., Keruly, J.C. (2007). CD4+ cell count 6 years after commencement of highly active antiretroviral therapy in persons with sustained virologic suppression. *Clinical Infectious Diseases*, 44 (3), 441–446.
- Mutlu, E.A., Keshavarzian, A., Losurdo, J., Swanson, G., Siewe, B., Forsyth, C., French, A., Demarais, P., Sun, Y., Koenig, L., Cox, S., Engen, P., Chakradeo, P., Abbasi, R., Gorenz, A., Burns, C., Landay, A. (2014). A compositional look at the human gastrointestinal microbiome and immune activation parameters in HIV infected subjects. *PLoS pathogens*, 10 (2), e1003829.

- Nazli, A., Chan, O., Dobson-Belaire, W.N., Ouellet, M., Tremblay, M.J., Gray-Owen, S.D., Arsenault, A.L., Kaushic, C. (2010). Exposure to HIV-1 directly impairs mucosal epithelial barrier integrity allowing microbial translocation. *PLoS pathogens*, 6 (4), e1000852.
- Noguera-Julian, M., Rocafort, M., Guillen, Y., Rivera, J., Casadella, M., Nowak, P., Hildebrand, F., Zeller, G., Parera, M., Bellido, R., Rodriguez, C., Carrillo, J., Mothe, B., Coll, J., Bravo, I., Estany, C., Herrero, C., Saz, J., Sirera, G., Torrella, A., Navarro, J., Crespo, M., Brander, C., Negredo, E., Blanco, J., Guarner, F., Calle, M.L., Bork, P., Sonnerborg, A., Clotet, B., Paredes, R. (2016). Gut Microbiota Linked to Sexual Preference and HIV Infection. *EBioMedicine*, 5, 135–146.
- Nolan, D. (2003). Metabolic complications associated with HIV protease inhibitor therapy. *Drugs*, 63 (23), 2555–2574.
- Nowak, P., Troseid, M., Avershina, E., Barqasho, B., Neogi, U., Holm, K., Hov, J.R., Noyan, K., Vesterbacka, J., Svard, J., Rudi, K., Sonnerborg, A. (2015). Gut microbiota diversity predicts immune status in HIV-1 infection. *AIDS*, 29 (18), 2409–2418.
- Nowak, R.G., Bentzen, S.M., Ravel, J., Crowell, T.A., Dauda, W., Ma, B., Liu, H., Blattner, W.A., Baral, S.D., Charurat, M.E. (2017). Rectal microbiota among HIV-uninfected, untreated HIV, and treated HIV-infected in Nigeria. *AIDS*, 31 (6), 857–862.
- O'Brien, T.R., Blattner, W.A., Waters, D., Eyster, M.E., Hilgartner, M.W., Cohen, A.R., Luban, N., Hatzakis, A., Aledort, L.M., Rosenberg, P.S., Miley, W.J., Kroner, B.L., Goedert, J.J. (1996). Serum HIV-1 RNA Levels and Time to Development of AIDS in the Multicenter Hemophilia Cohort Study. *JAMA*, 276 (2), 105–110.
- O'Connor, J., Vjecha, M.J., Phillips, A.N., Angus, B., Cooper, D., Grinsztejn, B., Lopardo, G., Das, S., Wood, R., Wilkin, A., Klinker, H., Kantipong, P., Klingman, K.L., Jilich, D., Herieka, E., Denning, E., Abubakar, I., Gordin, F., Lundgren, J.D. (2017). Effect of immediate initiation of antiretroviral therapy on risk of severe bacterial infections in HIV-positive people with CD4 cell counts of more than 500 cells per μL : Secondary outcome results from a randomised controlled trial. *The Lancet HIV*, 4 (3), e105-e112.
- Oleske, J., Minnefor, A., Cooper, R. Jr., Thomas, K., dela Cruz, A., Ahdieh, H., Guerrero, I., Joshi, V.V., Desposito, F. (1983). Immune deficiency syndrome in children. *JAMA*, 249 (17), 2345–2349.

-
- Panda, S., El khader, I., Casellas, F., Lopez Vivancos, J., Garcia Cors, M., Santiago, A., Cuenca, S., Guarner, F., Manichanh, C. (2014). Short-term effect of antibiotics on human gut microbiota. *PloS one*, 9 (4), e95476.
- Peng, L., He, Z., Chen, W., Holzman, I.R., Lin, J. (2007). Effects of butyrate on intestinal barrier function in a Caco-2 cell monolayer model of intestinal barrier. *Pediatric research*, 61 (1), 37–41.
- Perelson, A.S., Essunger, P., Cao, Y., Vesanen, M., Hurley, A., Saksela, K., Markowitz, M., Ho, D.D. (1997). Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy. *Nature*, 387 (6629), 188–191.
- Perez-Cobas, A.E., Artacho, A., Knecht, H., Ferrus, M.L., Friedrichs, A., Ott, S.J., Moya, A., Latorre, A., Gosalbes, M.J. (2013). Differential effects of antibiotic therapy on the structure and function of human gut microbiota. *PloS one*, 8 (11), e80201.
- Pérez-Santiago, J., Gianella, S., Massanella, M., Spina, C.A., Karris, M.Y., Var, S.R., Patel, D., Jordan, P.S., Young, J.A., Little, S.J., Richman, D.D., Smith, D.M. (2013). Gut Lactobacillales are associated with higher CD4 and less microbial translocation during HIV infection. *AIDS*, 27 (12), 1921–1931.
- Phillips, A.N., Gazzard, B., Gilson, R., Easterbrook, P., Johnson, M., Walsh, J., Leen, C., Fisher, M., Orkin, C., Anderson, J., Pillay, D., Delpech, V., Sabin, C., Schwenk, A., Dunn, D., Gompels, M., Hill, T., Porter, K., Babiker, A. (2007). Rate of AIDS diseases or death in HIV-infected antiretroviral therapy-naive individuals with high CD4 cell count. *AIDS*, 21 (13), 1717–1721.
- Piot, P., Quinn, T.C., Taelman, H., Feinsod, F.M., Minlangu, K.B., Wobin, O., Mbendi, N., Mazebo, P., Ndangi, K., Stevens, W. (1984). Acquired immunodeficiency syndrome in a heterosexual population in Zaire. *Lancet*, 2 (8394), 65–69.
- Poon, M.C., Landay, A., Prasthofer, E.F., Stagno, S. (1983). Acquired immunodeficiency syndrome with *Pneumocystis carinii* pneumonia and *Mycobacterium avium-intracellulare* infection in a previously healthy patient with classic hemophilia. Clinical, immunologic, and virologic findings. *Annals of internal medicine*, 98 (3), 287–290.
- Price, M.N., Dehal, P.S., Arkin, A.P. (2010). FastTree 2 - Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments. *PloS one*, 5 (3), e9490.
- Qin, N., Yang, F., Li, A., Prifti, E., Chen, Y., Shao, L., Guo, J., Le Chatelier, E., Yao, J., Wu, L., Zhou, J., Ni, S., Liu, L., Pons, N., Batto, J.M., Kennedy, S.P., Leonard, P., Yuan, C., Ding, W., Chen, Y., Hu, X., Zheng, B., Qian, G., Xu, W., Ehrlich, S.D.,

- Zheng, S., Li, L. (2014). Alterations of the human gut microbiome in liver cirrhosis. *Nature*, 513 (7516), 59–64.
- Ranjan, R., Rani, A., Metwally, A., McGee, H.S., Perkins, D.L. (2016). Analysis of the microbiome: Advantages of whole genome shotgun versus 16S amplicon sequencing. *Biochemical and biophysical research communications*, 469 (4), 967–977.
- Rios-Covian, D., Gueimonde, M., Duncan, S.H., Flint, H.J., de los Reyes-Gavilan, C.G. (2015). Enhanced butyrate formation by cross-feeding between *Faecalibacterium prausnitzii* and *Bifidobacterium adolescentis*. *FEMS microbiology letters*, 362 (21), fnv176.
- Riviere, A., Selak, M., Lantin, D., Leroy, F., de Vuyst, L. (2016). Bifidobacteria and Butyrate-Producing Colon Bacteria: Importance and Strategies for Their Stimulation in the Human Gut. *Frontiers in microbiology*, 7, 979.
- Robert Koch-Institut. (2016). *Schätzung der Zahl der HIV-Neuinfektionen und der Gesamtzahl von Menschen mit HIV in Deutschland: Stand Ende 2015*. Epidemiologisches Bulletin (45). doi: 10.17886/EpiBull-2016-066.2.
- Rubinstein, A., Sicklick, M., Gupta, A., Bernstein, L., Klein, N., Rubinstein, E., Spigland, I., Fruchter, L., Litman, N., Lee, H., Hollander, M. (1983). Acquired immunodeficiency with reversed T4/T8 ratios in infants born to promiscuous and drug-addicted mothers. *JAMA*, 249 (17), 2350–2356.
- Sandler, N.G., Douek, D.C. (2012). Microbial translocation in HIV infection: causes, consequences and treatment opportunities. *Nature reviews. Microbiology*, 10 (9), 655–666.
- Schubert, A.M., Rogers, M.A.M., Ring, C., Mogle, J., Petrosino, J.P., Young, V.B., Aronoff, D.M., Schloss, P.D. (2014). Microbiome data distinguish patients with *Clostridium difficile* infection and non-*C. difficile*-associated diarrhea from healthy controls. *mBio*, 5 (3), e01021-14.
- Scott, G.B., Buck, B.E., Leterman, J.G., Bloom, F.L., Parks, W.P. (1984). Acquired immunodeficiency syndrome in infants. *The New England journal of medicine*, 310 (2), 76–81.
- Siegal, F.P., Lopez, C., Hammer, G.S., Brown, A.E., Kornfeld, S.J., Gold, J., Hassett, J., Hirschman, S.Z., Cunningham-Rundles, C., Adelsberg, B.R. (1981). Severe acquired immunodeficiency in male homosexuals, manifested by chronic perianal ulcerative herpes simplex lesions. *The New England journal of medicine*, 305 (24), 1439–1444.

-
- Singer, E., Bushnell, B., Coleman-Derr, D., Bowman, B., Bowers, R.M., Levy, A., Gies, E.A., Cheng, J.-F., Copeland, A., Klenk, H.-P., Hallam, S.J., Hugenholtz, P., Tringe, S.G., Woyke, T. (2016). High-resolution phylogenetic microbial community profiling. *The ISME journal*, 10 (8), 2020.
- Slonczewski, J.L., Foster, J.W. (2012). *Mikrobiologie: Eine Wissenschaft mit Zukunft*. 2. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.
- Sokol, H., Seksik, P., Furet, J.P., Firmesse, O., Nion-Larmurier, I., Beaugerie, L., Cosnes, J., Corthier, G., Marteau, P., Dore, J. (2009). Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflammatory bowel diseases*, 15 (8), 1183–1189.
- Srinivasa, S., Grinspoon, S.K. (2014). Metabolic and body composition effects of newer antiretrovirals in HIV-infected patients. *European Journal of Endocrinology*, 170 (5), R185-R202.
- Stiksrud, B., Nowak, P., Nwosu, F.C., Kvale, D., Thalme, A., Sonnerborg, A., Ueland, P.M., Holm, K., Birkeland, S.-E., Dahm, A.E.A., Sandset, P.M., Rudi, K., Hov, J.R., Dyrhol-Riise, A.M., Troseid, M. (2015). Reduced Levels of D-dimer and Changes in Gut Microbiota Composition After Probiotic Intervention in HIV-Infected Individuals on Stable ART. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 70 (4), 329–337.
- Stürzl, M., Blasig, C., Schreier, A., Neipel, F., Hohenadl, C., Cornali, E., Ascherl, G., Esser, S., Brockmeyer, N.H., Ekman, M., Kaaya, E.E., Tschachler, E., Biberfeld, P. (1997). Expression of HHV-8 latency-associated T0.7 RNA in spindle cells and endothelial cells of AIDS-associated, classical and African Kaposi's sarcoma. *International journal of cancer*, 72 (1), 68–71.
- Suerbaum, S., Burchard, G.-D., Kaufmann, S.H.E., Schulz, T.F. (Hg.). (2016). *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 8. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Sun, Y., Ma, Y., Lin, P., Tang, Y.-W., Yang, L., Shen, Y., Zhang, R., Liu, L., Cheng, J., Shao, J., Qi, T., Tang, Y., Cai, R., Guan, L., Luo, B., Sun, M., Li, B., Pei, Z., Lu, H. (2016). Fecal bacterial microbiome diversity in chronic HIV-infected patients in China. *Emerging microbes & infections*, 5, e31.
- Suttorp, N., Möckel, M., Siegmund, B., Dietel, M. (Hg.). (2016). *Harrisons Innere Medizin*. 19. Auflage. Berlin: ABW Wissenschaftsverlagsgesellschaft.
- The CASCADE Collaboration. (2011). Timing of HAART initiation and clinical outcomes in human immunodeficiency virus type 1 seroconverters. *Archives of internal medicine*, 171 (17), 1560–1569.

- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C.M., Knight, R., Gordon, J.I. (2007). The human microbiome project. *Nature*, 449 (7164), 804–810.
- UN Joint Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). (2016). Global AIDS Update 2016. URL: http://www.who.int/hiv/pub/arv/global-AIDS-update-2016_en.pdf (Aufruf am 16.12.2017).
- Vaahtovuori, J., Munukka, E., Korkeamäki, M., Luukkainen, R., Toivanen, P. (2008). Fecal microbiota in early rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*, 35 (8), 1500–1505.
- Valdez, H., Lederman, M.M. (1997-1998). Cytokines and cytokine therapies in HIV infection. *AIDS clinical review*, 187–228.
- Vamanu, E., Pelinescu, D., Sarbu, I. (2016). Comparative Fingerprinting of the Human Microbiota in Diabetes and Cardiovascular Disease. *Journal of medicinal food*, 19 (12), 1188–1195.
- van de Perre, P., Rouvroy, D., Lepage, P., Bogaerts, J., Kestelyn, P., Kayihigi, J., Hekker, A.C., Butzler, J.P., Clumeck, N. (1984). Acquired immunodeficiency syndrome in Rwanda. *Lancet*, 2 (8394), 62–65.
- Vazquez-Castellanos, J.F., Serrano-Villar, S., Latorre, A., Artacho, A., Ferrus, M.L., Madrid, N., Vallejo, A., Sainz, T., Martinez-Botas, J., Ferrando-Martinez, S., Vera, M., Drona, F., Leal, M., Del Romero, J., Moreno, S., Estrada, V., Gosalbes, M.J., Moya, A. (2015). Altered metabolism of gut microbiota contributes to chronic immune activation in HIV-infected individuals. *Mucosal immunology*, 8 (4), 760–772.
- Veazey, R.S., DeMaria, M., Chalifoux, L.V., Shvetz, D.E., Pauley, D.R., Knight, H.L., Rosenzweig, M., Johnson, R.P., Desrosiers, R.C., Lackner, A.A. (1998). Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection. *Science*, 280 (5362), 427–431.
- ViiV Healthcare BV. (2018). Fachinformation Kivexa 600 mg/300 mg Filmtabletten. Zulassungsnummer EU/1/04/298/002. URL: <https://www.gsk-arzneimittel.de/assetManager.xml?action=getFi&id=00462309> (Aufruf am 14.07.2019).
- Villar-Garcia, J., Hernandez, J.J., Guerri-Fernandez, R., Gonzalez, A., Lerma, E., Guelar, A., Saenz, D., Sorli, L., Montero, M., Horcajada, J.P., Knobel Freud, H. (2015). Effect of probiotics (*Saccharomyces boulardii*) on microbial translocation and inflammation

-
- in HIV-treated patients: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 68 (3), 256–263.
- Vujkovic-Cvijin, I., Dunham, R.M., Iwai, S., Maher, M.C., Albright, R.G., Broadhurst, M.J., Hernandez, R.D., Lederman, M.M., Huang, Y., Somsouk, M., Deeks, S.G., Hunt, P.W., Lynch, S.V., McCune, J.M. (2013). Dysbiosis of the gut microbiota is associated with HIV disease progression and tryptophan catabolism. *Science translational medicine*, 5 (193), 193ra91.
- Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., Cole, J.R. (2007). Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and environmental microbiology*, 73 (16), 5261–5267.
- Wang, Z., Klipfell, E., Bennett, B.J., Koeth, R., Levison, B.S., Dugar, B., Feldstein, A.E., Britt, E.B., Fu, X., Chung, Y.-M., Wu, Y., Schauer, P., Smith, J.D., Allayee, H., Tang, W.H.W., DiDonato, J.A., Lusis, A.J., Hazen, S.L. (2011). Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature*, 472 (7341), 57–63.
- Wu, G.D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y.-Y., Keilbaugh, S.A., Bewtra, M., Knights, D., Walters, W.A., Knight, R., Sinha, R., Gilroy, E., Gupta, K., Baldassano, R., Nessel, L., Li, H., Bushman, F.D., Lewis, J.D. (2011). Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*, 334 (6052), 105–108.
- Yu, G., Fadrosch, D., Ma, B., Ravel, J., Goedert, J.J. (2014). Anal microbiota profiles in HIV-positive and HIV-negative MSM. *AIDS*, 28 (5), 753–760.
- Zhu, T., Korber, B.T., Nahmias, A.J., Hooper, E., Sharp, P.M., Ho, D.D. (1998). An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature*, 391 (6667), 594–597.
- Zoetendal, E.G., von Wright, A., Vilpponen-Salmela, T., Ben-Amor, K., Akkermans, A.D.L., de Vos, W.M. (2002). Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Applied and environmental microbiology*, 68 (7), 3401–3407.

Anhang

- Patienteninformation Mikrobiom bei HIV
- Einverständniserklärung

Analyse des Hautmikrobioms und –vioms und des Darmmikrobioms bei HIV positiven Patienten während der Rekonstruktion des Immunsystems

Patienteninformation

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

wir möchten Sie fragen, ob Sie bereit sind, an der nachfolgend beschriebenen Studie teilzunehmen.

Die Studie wurde von der zuständigen Ethikkommission zustimmend bewertet und wird vom Interdisziplinären HIV-Zentrum am Klinikum rechts des Isar (IZAR) veranlasst, organisiert und durchgeführt. Insgesamt werden 20 Personen daran teilnehmen.

Ihre Teilnahme an dieser Studie ist freiwillig. Sie werden in die Studie also nur dann einbezogen, wenn Sie dazu schriftlich Ihre Einwilligung erklären. Sofern Sie nicht an dieser Studie teilnehmen oder später aus ihr ausscheiden möchten, erwachsen Ihnen daraus keinerlei Nachteile. Bei einer Teilnahme entstehen für Sie keine zusätzlichen Kosten.

1. Warum wird diese Studie durchgeführt?

Das Mikrobiom bezeichnet die Gesamtheit aller den Menschen besiedelnden Mikroorganismen. Damit werden in erster Linie die Darmbakterien (Darmflora) in Verbindung gebracht, aber auch alle Mikroorganismen, die auf der Haut (Hautflora) leben. Analog versteht man unter Virom alle den Menschen besiedelnden Viren. Erst seit wenigen Jahren werden wissenschaftliche Projekte zur Untersuchung des Mikrobioms durchgeführt und versucht, alle den Menschen besiedelnden Bakterien und Viren genau zu identifizieren.

Die vorliegende Studie soll die Veränderung Ihres Mikrobioms und -vioms der Haut sowie das Darmmikrobiom im Laufe Ihrer medikamentösen Behandlung gegen HIV untersuchen. Davon erhoffen wir uns einen besseren Einblick in die Bedeutung des Mikrobioms und Vioms bei HIV für die Behandlung. Langfristig kann die Studie so helfen, völlig neue Therapieansätze bei HIV zu entwickeln.

2. Wie ist der Ablauf der Studie und was muss ich bei Teilnahme beachten?

Haben Sie sich dazu entschlossen, an der Studie teilzunehmen, wird die Vorgeschichte Ihrer Krankheit erhoben um anhand der Ein- und Ausschlusskriterien zu überprüfen, ob wir Sie in die Studie einschließen können.

Studienablauf

Zu Beginn der Studie werden bei Ihnen Hautabstriche durchgeführt und Sie werden gebeten, eine Stuhlprobe abzugeben. Außerdem wird Ihnen am Rücken eine 4 mm große Hautprobe in lokaler Betäubung entnommen. Dazu wird nach Desinfektion des jeweiligen Hautareals ein lokales Betäubungsmittel gespritzt und nach Einwirkzeit mit Hilfe einer 4mm im Durchmesser großen Stanze eine Hautprobe entnommen und die Wunde anschließend mit einem Stich genäht.

Nach Beginn der medikamentösen Behandlung werden die beschriebenen Untersuchungen (Hautabstrich, Stuhlprobe und Hautprobe) erneut in der 12. Behandlungswoche sowie in der 24. Behandlungswoche und anschließend erneut nach 12 Wochen in der 36. Behandlungswoche durchgeführt.

Zu beachten

Die Studiengesamtdauer beträgt insgesamt also 36 Wochen (ca. **9 Monate**) und für den Erfolg der Studie ist es von entscheidender Bedeutung, dass Sie zu allen festgelegten Terminen zuverlässig erscheinen. Zusätzliche Medikamente (auch rezeptfreie) dürfen Sie – außer bei Notfällen – nur nach Rücksprache mit Ihrem Prüfarzt einnehmen.

3. Erhalte ich ein Studienmedikament?

Da es sich bei dieser Studie nicht um eine Therapiestudie handelt, wird auch KEIN Medikament getestet. Sie erhalten zu keinem Zeitpunkt eine Testsubstanz ("Studienmedikament"). Es wird nur die Veränderung Ihres Mikrobioms und Viroms unter der HIV Behandlung mit Ihren verordneten Medikamenten untersucht.

4. Welchen persönlichen Nutzen habe ich von der Teilnahme an der Studie?

Durch Ihre Teilnahme tragen Sie dazu bei, dass die Rolle des Mikrobioms und Viroms bei HIV Infektionen erforscht werden kann. Langfristig können so z.B. neue Therapieansätze entstehen und neue Behandlungsmöglichkeiten entwickelt werden.

5. Welche Risiken und möglichen Komplikationen sind mit der Teilnahme an der Studie verbunden?

In der Studie angewandte Untersuchungen und Therapien können zu unerwünschten Wirkungen führen, die aber nicht zwangsläufig bei jedem auftreten.

Stuhlproben und Hautabstriche

Sowohl bei Abgabe von Stuhlproben als auch bei der korrekten Durchführung von Hautabstrichen sind keinerlei unerwünschte Wirkungen oder Risiken bekannt.

Hautbiopsien (PE)

Die Risiken der Entnahme einer Hautbiopsie mit Hilfe einer Stanze und in Lokalanästhesie können sein: Schmerzen, Nachblutung, Wundheilungsstörungen, unbefriedigendes kosmetisches Ergebnis, störende Narbenbildung, Unverträglichkeit des eingesetzten Medikaments für die Lokalanästhesie bis hin zu einer schweren allergischen Reaktion (sehr selten).

Bitte teilen Sie Ihrem Prüfarzt umgehend **alle** Beschwerden, Erkrankungen oder Verletzungen mit, die zu irgendeinem Zeitpunkt im Verlauf der Studie bei Ihnen auftreten.

4. Erhalte ich eine Aufwandsentschädigung?

Für die Teilnahme an dieser Studie erhalten Sie eine Aufwandsentschädigung von 20,00€ pro Untersuchungstermin. An 4 Terminen, an denen Sie planmäßig auch außerhalb der Studie zu den Routineuntersuchungen zu uns kommen, werden die Studienuntersuchungen

durchgeführt, so dass Sie insgesamt für die 4 Termine 80,00€ erhalten. Dieses wird auf ein von Ihnen anzugebendes Konto nach Ablauf der Studie überwiesen.

5. Wer darf an dieser Studie nicht teilnehmen?

An der Studie dürfen Sie nicht teilnehmen, wenn Sie gleichzeitig an anderen klinischen Prüfungen oder Forschungsprojekten teilnehmen oder vor kurzem teilgenommen haben oder bereits eine HIV Therapie mit Medikamenten eingeleitet wurde.

8. Wer entscheidet, ob ich aus der Studie ausscheide?

Sie können jederzeit, auch ohne Angabe von Gründen, Ihre Teilnahme beenden, ohne dass Ihnen dadurch irgendwelche Nachteile bei Ihrer medizinischen Behandlung entstehen. Falls Risiken für Ihre Gesundheit bestehen, ist es die Pflicht jedes Studienarztes, die Untersuchungen bei Ihnen abubrechen. In beiden Fällen wird der Prüfarzt mit Ihnen die weitere Behandlung besprechen.

9. Was geschieht mit meinen Daten?

Während der klinischen Prüfung werden medizinische Befunde und persönliche Informationen von Ihnen erhoben und in der Prüfstelle in Ihrer persönlichen Akte niedergeschrieben oder elektronisch gespeichert. Die für die Studie wichtigen Daten werden zusätzlich in **pseudonymisierter Form** gespeichert, ausgewertet und gegebenenfalls weitergegeben. Pseudonymisiert bedeutet, dass keine Angaben von Namen oder Initialen verwendet werden, sondern nur ein Nummern- und/oder Buchstabencode, evtl. mit Angabe des Geburtsjahres. Die Daten sind gegen unbefugten Zugriff gesichert.

10. Was geschieht mit meinen Proben?

Sämtliche Abstriche, Stuhlproben und Hautproben werden nach Ihrer schriftlichen Einwilligung unter Beachtung der gesetzlichen Datenschutzbestimmungen im Studienzentrum aufbewahrt und genutzt.

11. An wen wende ich mich bei weiteren Fragen?

Bitte zögern Sie nicht, in Ihrem Aufklärungsgespräch alle Punkte anzusprechen, die Ihnen noch unklar sind. Auch bei später auftretenden Fragen oder wenn Sie Nebenwirkungen beobachten oder eine medizinische Behandlung benötigen, wenden Sie sich bitte ohne zu zögern an Ihren Studienarzt.

Ihr Ansprechpartner für die Studie:

Prof. Dr. med. Claudia Traidl-Hoffmann
Interdisziplinäres HIV-Zentrum am Klinikum rechts der Isar
der Technischen Universität München
Ismaninger Str. 22
81675 München
Tel.: **089 - 4140 - 9862** oder - 3472
Fax.: 089 - 4140 – 3453

Patientenetikett

Analyse des Hautmikrobioms und –viroms und des Darmmikrobioms bei HIV positiven Patienten während der Rekonstruktion des Immunsystems

Einverständniserklärung

Ich bin in einem persönlichen Gespräch mit (Name Arzt/Ärztin) ausführlich und verständlich über die Studie sowie über Wesen, Bedeutung, Risiken und Tragweite der Studie aufgeklärt worden. Ich hatte ausreichend Gelegenheit, mit dem Prüfarzt über die Durchführung der Studie zu sprechen und Fragen zu stellen. Alle meine Fragen wurden zufrieden stellend beantwortet.

Ich hatte ausreichend Zeit, mich zu entscheiden. Ein Exemplar der Patienten-Information und -Einwilligung habe ich erhalten.

Ich erkläre mich bereit, freiwillig an dieser Studie teilzunehmen, behalte mir jedoch vor, dieses Einverständnis jederzeit zurückziehen zu können.

.....
Ort, Datum Name des **Patienten** in Druckbuchstaben Unterschrift des **Patienten**

Ich habe das Aufklärungsgespräch geführt und die Einwilligung des Patienten eingeholt.

.....
Ort, Datum Name des Prüfarztes/der Prüfarztin Unterschrift Prüfarzt

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass die von mir entnommenen Blut, Haut und Stuhlproben aufbewahrt und für wissenschaftliche Untersuchungen im Rahmen dieser Studie verwendet werden können. Die Aufbewahrung der Proben erfolgt im Institut für Umweltmedizin, UNIKA-T, Ismaningerstr. 22, 81675 München. Ich verzichte auf eine eventuelle wirtschaftliche Nutzung wissenschaftlicher Resultate.

Datenschutzrechtliche Einwilligung

Die bei mir gemessenen Resultate werden auf einem Erfassungsbogen festgehalten, der anschließend in eine anonymisierte Computerdatei aufgenommen wird. Außer den zur Verschwiegenheit verpflichteten Prüfarzten und Versuchsleitern wird niemand meine Personalien erfahren. Die Belange des Datenschutzes sind gewährleistet.

Danksagung

Mein großer Dank gilt Frau Univ.-Prof. Dr. Claudia Traidl-Hoffmann für die Überlassung des Themas und die fachliche Betreuung meiner Promotionsarbeit.

Ich danke Herrn Dr. Matthias Reiger und Herrn PD Dr. Alexander Zink, die mir während des gesamten Projekts mit Rat und Tat zur Seite standen, für die umfassende Betreuung und die motivierende Zusammenarbeit.

Bei Herrn PD Dr. med. Christoph Spinner möchte ich mich für die Unterstützung bei der Studienplanung und bei der Patientenrekrutierung bedanken.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Avidan Neumann für seine zielführende Beratung bei der Auswertung der Daten.

Dem Team des Interdisziplinären HIV-Zentrums am Klinikum rechts der Isar danke ich für die Hilfe bei der Organisation der Untersuchungstermine.

Ich danke meiner Familie für ihre bedingungslose Unterstützung und ich danke Bastian für alles.