

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Universität zu Köln  
Klinik I für Innere Medizin  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. M. Hallek

Einfluss von Cytochrom P450 2B6 single nucleotide polymorphisms (SNPs) auf den  
frühen Therapieabbruch mit Efavirenz bei HIV-infizierten Patienten

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Universität zu Köln

Vorgelegt von  
Martin Platten  
aus Bergisch Gladbach

Promoviert am 23. März 2011

Aktivcopy, Köln

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

2011

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. J. Klosterkötter

1. Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. med. G. Fätkenheuer

2. Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Dr. h. c. H. Pfister

### Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen erhalten.

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin / eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Köln, 14.09.2010



Die dieser Arbeit zugrunde liegenden klinischen Daten wurden von der Datenbank des Deutschen Kompetenznetzes HIV/AIDS zur Verfügung gestellt.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Messergebnisse wurden ohne meine Mitarbeit im Department of Pharmacology And Therapeutics der University of Liverpool ermittelt.

Für Jan

### Danksagung

Herrn Universitätsprofessor Dr. med. M. Hallek danke ich für die Möglichkeit, an seiner Klinik diese Arbeit durchgeführt haben zu können.

Herrn Universitätsprofessor Dr. med. G. Fätkenheuer bin ich für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit zu großem Dank verpflichtet.

Für die Durchführung der Laborarbeiten zu dieser Arbeit danke ich Herrn Dr. A. Owen und Frau D. Egan vom Department Of Pharmacology And Therapeutics der University Of Liverpool sowie Frau H. Hendra von der Universität zu Köln.

Für die freundliche Unterstützung bei der Sammlung der epidemiologischen Daten danke ich dem Personal der Infektionsambulanz der Klinik I für Innere Medizin der Universität zu Köln.

Für die Unterstützung meiner Arbeit möchte ich herzlich Herrn Dr. med. C. Wyen danken.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>8</b>
1.1	HUMANES IMMUNDEFIZIENZ-VIRUS (HIV)	8
1.1.1	Infektion und Replikationszyklus	9
1.1.2	Übertragungswege	10
1.2	HIV & AIDS	11
1.2.1	Historie	11
1.2.2	Epidemiologie	12
1.2.3	Pathogenese	13
1.2.4	Klinik	14
1.3	ANTIRETROVIRALE THERAPIE (ART)	14
1.3.1	Historie	14
1.3.2	Nukleosidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren (NRTI)	16
1.3.3	Protease-Inhibitoren (PI)	16
1.3.4	Entry-Inhibitoren	16
1.3.5	Integrase-Inhibitoren	17
1.3.6	Nicht nukleosidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren (NNRTI)	17
1.3.6.1	Pharmakokinetik von EFV	19
1.3.6.2	Pharmakogenetik von EFV	19
1.4	FRAGESTELLUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT	22
<b>2</b>	<b>MATERIAL &amp; METHODIK</b>	<b>24</b>
2.1	MATERIAL	24
2.1.1	Substanzen	24
2.1.2	Ausrüstung	25
2.2	METHODIK	25
2.2.1	Patientenkollektiv	25
2.2.2	Untersuchungsmaterial	27
2.2.3	Ermittlung der SNPs	27
2.2.3.1	DNA-Extraktion	27
2.2.3.2	Quantifikation der gDNA	29
2.2.3.3	PCR	30
2.2.3.4	RT-qPCR	31
2.2.4	statistische Auswertung	32
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>34</b>
3.1	PATIENTENKOLLEKTIV	34
3.2	GENOTYPFREQUENZEN	35
3.3	UNTERSCHIEDE ZWISCHEN KONTROLL- UND STUDIENGRUPPE	35
3.3.1	Ethnische Herkunft	35
3.3.2	Geschlecht	36
3.3.3	Alter	37
3.3.4	Genotypen	37
3.3.4.1	CYP2B6 G516T	37
3.3.4.2	CYP2B6 T983C	38
3.3.4.3	CAR C540T	38
3.3.4.4	PXR T44477C	39
3.3.4.5	PXR C63396T	39
3.3.4.6	PXR A7635G	39
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>40</b>
4.1	DEMOGRAPHISCHE FAKTOREN	40
4.1.1	Ethnische Zugehörigkeit	40
4.1.2	Geschlecht	41
4.1.3	Alter	43
4.2	CYP2B6	43
4.2.1	CYP2B6 G516T	45
4.2.1.1	Einfluss von CYP2B6 G516T auf den EFV-Plasmaspiegel	45
4.2.1.2	Assoziation von CYP2B6 G516T mit Nebenwirkungen unter EFV	46

4.2.2	<i>CYP2B6 T983C</i> .....	50
4.3	CAR C540T.....	51
4.4	PXR.....	52
4.4.1	<i>PXR T44477C</i> .....	53
4.4.2	<i>PXR C63396T</i> .....	54
4.4.3	<i>PXR A7635G</i> .....	55
4.5	ABSCHLIEBENDE BETRACHTUNG.....	55
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	60
6	LITERATURVERZEICHNIS .....	61
7	LEBENS LAUF .....	78

# 1 Einleitung

## 1.1 *Humanes Immundefizienz-Virus (HIV)*

HIV ist der Erreger des erworbenen Immundefizienz-Syndroms beim Menschen (englisch *acquired immunodeficiency syndrome*, Akronym AIDS). Es gehört zur Familie der Retroviridae, zur Unterfamilie der Orthoretrovirinae und zur Gattung Lentivirus. Die Retroviridae besitzen als namensgebende Besonderheit die Reverse Transkriptase (RT), ein Enzym, das in der Lage ist, einzelsträngige RNA in doppelsträngige DNA zu übersetzen. Der Begriff Lentivirus leitet sich vom lateinischen Adjektiv *lentus* ab, was unter anderem mit „langsam“, aber auch mit „langanhaltend“ übersetzt wird (Stowasser 1998, 292; *lentus*). So zeichnen sich Infektionen mit Lentiviren durch eine lange Inkubationszeit und einen chronischen Verlauf mit langsamer Progredienz über Monate bis Jahre aus.

Es sind zwei Typen von HIV bekannt, HIV-1 und HIV-2; Unterschiede finden sich im Molekulargewicht und in der Anordnung der Nukleotidsequenz der Gene. HIV-1 wird in die Subgruppen M (für englisch „major“, Hauptgruppe), O (für englisch „outlier“, Sonderfall), N (für englisch „new variant“, neue Variante) und P unterteilt. Die Subgruppe M ist mit über 90% aller Fälle weltweit am häufigsten zu finden und gliedert sich nochmals in die neun Subtypen A bis D, F bis H, J und K, die sich in der Aminosäuresequenz des Virushüllproteins *env* (envelope) unterscheiden. In Europa und Nordamerika herrscht der Subtyp B vor, in Asien der Subtyp C; in Afrika finden sich am häufigsten die Subtypen A, C und D.

Neben diesen Subtypen finden sich sogenannte *circulating recombinant forms* (CRF, zirkulierende rekombinante Formen); diese sind keine eigenständigen Subtypen, sondern resultieren aus der gleichzeitigen Infektion einer Zelle durch unterschiedliche Subtypen. Dabei kommt es zur Vermischung des genetischen Materials der beteiligten Subtypen („viral sex“), wodurch ein Hybrid-Virus entsteht (Burke 1997). Nicht alle Hybrid-Viren sind lebensfähig. Nur die erfolgreichen Varianten, die sich vermehren und verbreiten können, werden auch entdeckt und dann als CRF bezeichnet.

HIV-2 findet sich hauptsächlich in Westafrika und wird in sieben Subtypen (A bis G) unterteilt, von denen die Subtypen A und B am häufigsten sind. Weltweit betrachtet ist HIV-2 selten.

HIV-1 wurde 1983 unabhängig voneinander entdeckt und in Zusammenhang mit AIDS gebracht von Robert C. Gallo und von Luc Montagnier (Gallo 1983; Barre-



Sinoussi 2004). HIV-2 wurde erstmals 1986 beschrieben von Francois Clavel (Clavel 1986).

Man geht heute davon aus, dass die Subgruppen M, N, O und P von HIV-1 sowie die Subtypen A bis G von HIV-2 durch voneinander unabhängige Interspezies-Übertragungen des Simian Immunodeficiency Virus (SIV) von Primaten auf den Menschen entstanden sind. Es kam vermutlich dadurch zur Übertragung auf den Menschen, dass in Afrika Primaten bis heute gejagt und deren Fleisch („bush meat“) verzehrt wird (Peeters 2008).

### **1.1.1 Infektion und Replikationszyklus**

Das Glykoprotein 120 (gp120) aus der Hülle von HIV bindet beim Andocken an die Wirtszelle an den CD4-Rezeptor. Dieser findet sich bei den Vorläufern der T-Lymphozyten in Knochenmark und Thymus und bei der CD4-Rezeptor-positiven Subpopulation der T-Lymphozyten, auch T-Helferzellen genannt, welche etwa 60% der gesamten T-Zell-Population ausmachen. Außerdem werden CD4-Rezeptoren gefunden bei Monozyten und Makrophagen, eosinophilen Granulozyten, Mikrogliazellen des ZNS und dendritischen Zellen. Der CD4-Rezeptor interagiert natürlicherweise mit HLA2-Molekülen; er ist bei T-Lymphozyten Bestandteil des T-Zell-Rezeptors (TCR). Durch Interaktion mit dem CD4-Rezeptor kommt es zu einer Konformationsänderung von gp120, wodurch Bindungsstellen für einen weiteren Rezeptor exponiert werden, die sogenannte V3-Schleife. Zum Eindringen in die Zielzelle benötigt HIV neben dem CD4-Rezeptor zusätzlich den Chemokinrezeptor CCR5 (mit der Domäne Cystein-Cystein-Rest-5) bzw. CXCR4 (Cystein-X-Cystein-Rest-4). Es gibt T-trope HIV-Isolate, die vorwiegend aktivierte T-Lymphozyten infizieren; diese benötigen den CXCR4-Rezeptor zum Eindringen in die Wirtszelle. M-trope HIV-Isolate interagieren mit dem CCR5-Rezeptor und befallen neben T-Lymphozyten auch Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen. Es sind in der Regel M-trope HIV-Isolate, die bei einer Primärinfektion übertragen werden, da diese zur Infektion eine geringere Konzentration an CD4-Rezeptoren auf der Zellmembran der Wirtszelle benötigen als T-trope Isolate, und weil ihre Zielzellen, dendritische Zellen und Makrophagen, auch in den Schleimhäuten zu finden sind. Die Bindung sowohl des CD4- als auch des jeweiligen Corezeptors führt zu einer Konformationsänderung des gp41, zur Insertion des hydrophoben NH<sub>2</sub>-terminalen

Endes in die Wirtszellmembran und damit zur Fusion der Membranen von Virus und Zielzelle.

Nach der Membranfusion wird der Inhalt des Virus in das Zytoplasma der Wirtszelle entleert („uncoating“). Die Reverse Transkriptase übersetzt die einzelsträngige virale RNA in doppelsträngige provirale DNA, welche noch nicht in das Wirtsgenom integriert ist. Erst bei Aktivierung der Wirtszelle kann das Enzym Integrase das HIV-Genom in das Erbgut des Wirtes integrieren, Voraussetzung für die Produktion neuer Virionen (Zack 1990). Die Reverse Transkriptase weist eine hohe Fehlerquote auf, was eine hohe Mutationsrate bedeutet. Man spricht von Quasispezies, innerhalb derer Selektion und damit Evolution stattfindet. Mit dieser Wandelbarkeit von HIV erklärt sich die Problematik rasch auftretender Resistenzen gegen antiretrovirale Medikamente.

Der Bau eines neuen Virions (assembly) erfolgt schrittweise. Pol liefert die Enzyme Reverse Transkriptase, Protease und Integrase. Die anderen beiden Gene gag und env liefern zunächst Präkursorproteine, die durch die Protease in die eigentlichen funktionellen Bestandteile zerschnitten werden. Aus den Produkten der Gene gag und pol formiert sich zusammen mit der HIV-RNA der Viruskern, env liefert die Hüllproteine gp41 und gp120. Der Viruspartikel sprosst aus der Zellmembran aus (budding), nimmt einen Teil der Membran mitsamt einigen zelleigenen Hüllproteinen als Virushülle mit und kann nun eine weitere Zelle infizieren.

### **1.1.2 Übertragungswege**

HIV wird durch Kontakt mit infektiösen Körperflüssigkeiten übertragen, vor allem Blut, Sperma und Vaginalsekrete. Dabei korreliert die Wahrscheinlichkeit einer Ansteckung mit der Viruskonzentration in der jeweiligen Flüssigkeit (Gray 2001). Da kurz nach der Ansteckung noch keine adaptive Immunantwort gegen HIV ausgebildet ist, kann das Virus weitgehend ungehindert replizieren und der Infizierte weist eine hohe Viruslast auf. Außerdem steigt die Viruslast im späteren Verlauf einer unbehandelten HIV-Infektion wieder an, wenn das Immunsystem zunehmend insuffizient wird und HIV nicht mehr an der Vermehrung zu hindern in der Lage ist. Das führt dazu, dass die Infektiosität in diesen Stadien der Infektion am größten ist (Wawer 2005; Hollingsworth 2008). Intakte Haut bietet einen besseren Schutz gegen Infektion als Schleimhäute; eine Erhöhung des Übertragungsrisikos ergibt sich bei

genitalen Entzündungen, Geschlechtskrankheiten sowie Läsionen und feinen Verletzungen der Haut, wie sie z.B. beim Geschlechtsverkehr entstehen können. Am häufigsten wird HIV durch ungeschützte Sexualkontakte übertragen. Der gemeinsame Gebrauch von Spritzutensilien, meist unter intravenös Drogenabhängigen, ist eine weitere wichtige Infektionsursache; akzidentelle Nadelstichverletzungen oder Kontakt von virushaltigem Blut mit Schleimhäuten oder offenen Wunden im Gesundheitswesen führen nur sehr selten zur Infektion. In Europa heute nahezu ausgeschlossen ist eine Ansteckung durch Bluttransfusion und Blutprodukte, da dort seit Ende der 1980er Jahre alle Blutspenden auf Antikörper gegen HIV-1 und -2 getestet werden. Die Wahrscheinlichkeit einer Infektion ist hier vermutlich kleiner als 1:1.000.000 (Lackritz 1995). HIV-infizierte Mütter können ihre Kinder perinatal durch Kontakt mit dem mütterlichen Blut und postnatal über die Muttermilch infizieren. Über die Placentaschranke kann das Virus in der Regel nicht auf das Kind übergehen. Mit einer Übertragungsrate von unter 1% ist die Infektion des Kindes durch die Mutter heute dank antiretroviraler Prophylaxe, elektiver Sectio und dem Verzicht auf das Stillen selten geworden. Vor Einsatz medizinischer Intervention in Europa wurden etwa 15% der Kinder durch ihre Mütter infiziert (Connor 1994). Nicht übertragen wird HIV durch Speichel, Tränen, Schweiß und Insektenstiche.

## **1.2 HIV & AIDS**

### **1.2.1 Historie**

1981 wurde das ungewöhnlich gehäufte Auftreten seltener und tödlich verlaufender Erkrankungen gemeldet, die sonst nur bei ausgeprägter Immunsuppression vorkommen; dazu zählten Pneumocystis-Pneumonien, Kaposi-Sarkome und mucosale Candidiasis, sowie weitere schwere virale Infektionen. Die Erkrankungen betrafen hauptsächlich homosexuelle Männer, die zuvor gesund gewesen waren. Als Ursache wurde eine erworbene Immunschwäche beschrieben (Gottlieb 1981; Masur 1981; Siegal 1981; Gerstoft 1982). 1983 wurde das verantwortliche Virus HIV-1 von Robert Gallo und Luc Montagnier entdeckt, und die erworbene Immunschwäche erhielt den Namen AIDS (acquired immunodeficiency syndrome). Es zeigte sich, dass das Auftreten von AIDS nicht allein auf homosexuelle Männer beschränkt war, sondern dass auch intravenös Drogenabhängige, Empfänger von Blut und Blutprodukten und Kinder AIDS-kranker Mütter betroffen waren. Die zunächst in der

Bevölkerung verbreitete Annahme, AIDS betreffe nur Randgruppen, erwies sich als falsch; auch Heterosexuelle erkrankten. Mit der Verfügbarkeit eines HIV-Antikörper-Nachweises im Blut ab 1985 wurden Menschen entdeckt, die HIV-Antikörper im Blut hatten, aber nicht erkrankt waren. Man erkannte, dass zwischen Infektion und AIDS-Erkrankung Monate bis Jahre vergehen können. Die rasche Zunahme der AIDS-Fälle in den 1980er Jahren, die eine gewaltige Epidemie befürchten ließ, verlangsamte sich und blieb seit Anfang der 1990er Jahre stabil bei etwa 2000 bis 3000 neuen Fällen pro Jahr in Deutschland.

### **1.2.2 Epidemiologie**

Im Jahr 2008 waren weltweit schätzungsweise 33,4 Mio. Menschen HIV-infiziert, darunter 31,3 Mio. Erwachsene und 2,1 Mio. Kinder im Alter unter 15 Jahren. Frauen stellen etwa 50% der Menschen mit HIV-Infektion. Es traten 2,7 Mio. Neuinfektionen auf, und 2 Mio. Menschen starben an AIDS. Der prozentuale Anteil HIV-Infizierter an der Weltbevölkerung ist seit 2000 gesunken. Nach wie vor am schwersten betroffen ist Afrika südlich der Sahara, wo 67% aller HIV-Infizierten leben und 72% der AIDS-Toten zu beklagen sind. Dort ist die Allgemeinbevölkerung betroffen, während in allen anderen Teilen der Erde hauptsächlich intravenös Drogenabhängige, Männer, die Sex mit Männern haben (MSM), und Prostituierte infiziert sind. Während die Zahl der Neuinfektionen wie auch in Teilen Asiens und Lateinamerikas sinken, beobachtet man einen Anstieg in Russland, Indonesien und einigen Industrienationen, darunter auch in Deutschland (UNAIDS 2009). So gab es hier im Jahr 2009 mit etwa 3000 Neudiagnosen eine Verdopplung gegenüber 2001, als die bislang niedrigste Zahl von 1443 ermittelt worden war (RKI 2009).

Für das Jahr 2009 ergaben sich für die geschätzten Neuinfektionen folgende Prozentwerte. Mit 72% den größten Anteil machten MSM aus. Ungeschützter Sex, steigende Zahlen anderer sexuell übertragener Krankheiten wie Lues und ein Trend zu späterem ART-Beginn werden für diesen Anstieg verantwortlich gemacht (Hamouda 2007). An zweiter Stelle standen heterosexuelle Kontakte mit 20% der Neuinfektionen, gefolgt von intravenös Drogenabhängigen mit 8%. Weniger als 1% der Neuinfektionen betrafen Neugeborene, die peripartal durch ihre Mütter infiziert wurden.

Wegen der breiten Verfügbarkeit antiretroviraler Medikamente in den Industrieländern hat die geschätzte Zahl der AIDS-Fälle abgenommen und wird in

Deutschland mit 1.100 Neuerkrankungen in 2009 beziffert. Ende 2009 lebten etwa 67.000 Menschen in Deutschland mit einer HIV-Infektion und 11.300 mit AIDS. Seit Beginn der Epidemie in Deutschland im Jahr 1982 haben sich etwa 86.500 Menschen mit HIV infiziert; 36.500 sind an AIDS erkrankt und 28.000 an AIDS verstorben (RKI 2009).

### **1.2.3 Pathogenese**

Die Infektion mit HIV führt zu einer erheblichen funktionellen Störung des Immunsystems. Die ersten Zellen, die im Rahmen der akuten Infektion durch HIV infiziert werden, sind die in den Schleimhäuten liegenden Langerhans-Zellen (Simonitsch 2000). Die Langerhans-Zellen wandern nach Kontakt mit Antigenen zu den regionalen Lymphknoten und führen dort durch Interaktion mit anderen Zellen des Immunsystems zu einer Infektion der T-Helferzellen und anderer CD4-positiver Zellen. Von den Lymphknoten aus kann sich HIV über Lymphbahnen und den Blutkreislauf im ganzen Körper verbreiten.

Eine HIV-Infektion führt zu einem fortschreitenden Verlust von T-Helfer-Zellen, der mit einer Schädigung und Fibrose des lymphatischen Gewebes assoziiert ist (Schacker 2002). Die Abnahme der T-Helfer-Zellen ist die bedeutsamste Ursache für die Störung der Immunfunktionen und die Pathogenese von AIDS. HIV kann sowohl ruhende als auch aktivierte T-Helfer-Zellen infizieren. Über verschiedene Mechanismen kommt es zum Untergang der befallenen Zellen. Wenn ruhende T-Helferzellen HIV binden, kommt es zur vermehrten Expression von CD62L (L-Selectin) und Fas. CD62L ist ein Homing-Rezeptor und veranlasst die T-Helfer-Zellen, aus dem peripheren Blut in die Lymphknoten zurückzukehren. Fas ist ein Rezeptor, der bei Bindung des Fas-Liganden zur Apoptose führt. Viele der in die Lymphknoten gewanderten T-Helferzellen sterben denn auch dort ab (Ji 2007). Werden infizierte T-Helferzellen aktiviert, führt erst dies zur vollständigen Integration des HIV-Genoms in das Wirtsgenom und damit zur massenhaften Replikation von HIV. Man spricht von einer produktiven im Gegensatz zu einer latenten Infektion, die keine oder nur wenige neue HIV-Virionen hervorbringt. Aktivierte T-Helferzellen können im Wesentlichen auf zweierlei Arten zugrunde gehen: Zum einen durch den zytopathischen Effekt von HIV selbst, zum anderen durch die Expression HIV-eigener viraler Peptide an der Zelloberfläche im Verbund mit HLA-I-Rezeptoren. Diese Komplexe werden durch CD8-positive T-Zellen erkannt, die daraufhin die

Apoptose der infizierten Zelle einleiten. Die Depletion der T-Helferzellen führt zu einer gestörten Funktionalität des gesamten Immunsystems und schließlich zu AIDS.

#### **1.2.4 Klinik**

Ohne Behandlung verläuft eine HIV-Infektion folgendermaßen: Nach einer Inkubationszeit von Tagen bis wenigen Wochen kommt es in 40 – 90% der Fälle zum akuten HIV-Syndrom, das sieben bis zehn Tage, selten länger als zwei Wochen anhält. Leitsymptome sind Fieber, Abgeschlagenheit, orale Ulzerationen, Pharyngitis und Gewichtsverlust (Hecht 2002). Bei vielen Patienten tritt ein makulöses HIV-Exanthem auf. Ebenfalls häufig finden sich Myalgien, Arthralgien und Nachtschweiß. Die Symptomatik der akuten HIV-Infektion ist sehr variabel, unspezifisch und kann gänzlich fehlen.

Daran schließt sich eine asymptomatische Phase an, die Monate bis Jahre dauert. Bei fast allen Patienten kommt es nach einem unterschiedlich langen Zeitraum auf Grund der zunehmenden T-Zell-Depletion zu Erkrankungen, die mit dem sich verschlechternden Immunstatus assoziiert sind. Darunter fallen vor allem opportunistische Erkrankungen, die nur bei ausgeprägtem Immundefekt auftreten. Einige dieser Erkrankungen definieren AIDS, so beispielsweise die Pneumocystis-Pneumonie, das Kaposi-Sarkom, ösophageale Candidose und Toxoplasmose. Alle anderen Krankheiten, die nicht AIDS definieren, zählt man zum sogenannten AIDS related complex (ARC). Unbehandelt sterben 90% der HIV-Infizierten an AIDS. Zwischen dem Auftreten der ersten AIDS-definierenden Erkrankung und dem Tod liegen bei unbehandelten Patienten in der Regel zwei bis vier Jahre.

### **1.3 Antiretrovirale Therapie (ART)**

#### **1.3.1 Historie**

Es gelang rasch nach der Entdeckung von HIV, erste kausal wirksame Medikamente zu entwickeln, die HIV in seiner Replikation behindern. 1987 kam Zidovudin (AZT), ein nukleosidischer Reverse Transkriptase-Inhibitor (NRTI), auf den Markt, gefolgt von weiteren Nukleosidanaloga in den Jahren 1991 bis 1994. Doch die Wirksamkeit der neuen Substanzen war wegen der schnellen Resistenzentwicklung von HIV unter einer Monotherapie nur von kurzer Dauer. Die Concorde-Studie aus dem Jahre 1994 zeigte, dass es keinen Unterschied bezüglich der Progression zu AIDS und bezüglich

der Mortalität machte, ob man Patienten frühzeitig oder erst später mit Zidovudin behandelte (Concorde Concorde 1994). Wesentliche Fortschritte gab es in dieser Zeit lediglich in der Behandlung opportunistischer Erkrankungen. Das Jahr 1996 war ein Wendepunkt in der HIV-Medizin. Die Ergebnisse zweier Studien, der amerikanischen ACTG175- (Hammer 1996) und der europäisch-australischen DELTA-Studie (Delta 1996), zeigten, dass die Kombination zweier NRTI signifikant wirksamer war als die bisher durchgeführten Monotherapien, und dass die Progression zu AIDS verzögert und die Mortalität gesenkt wurde. Zudem wurden Anfang 1996 drei Substanzen einer neuen Wirkstoffklasse, der Protease-Inhibitoren (PI), zugelassen, mit der Substanz Nevirapin im Sommer 1996 gefolgt von einer weiteren Wirkstoffklasse, den nicht nukleosidischen Reverse Transkriptase-Inhibitoren (NNRTI). Mit der breiten Einführung der sogenannten hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART), einer Kombination von in der Regel zwei NRTIs und einem PI, wurde die Inzidenz von AIDS in Europa zwischen 1994 und 1998 von 30,7 auf 2,5 / 100 Patientenjahre gesenkt (Mocroft 2000). Die Mortalität sank zwischen 1995 bis 1997 von 29,4 auf 8,8 / 100 Patientenjahre (Palella 1998). Es zeigte sich, dass auch NNRTI in Kombination mit zwei NRTIs bei therapienaiven Patienten den PI vergleichbare, teils sogar bessere Ergebnisse erzielten, was Viruslastreduktion und CD4-Zellzahl-Anstieg angeht (Torre 2001; Robbins 2003; MacArthur 2006). Gegenüber einer Kombination aus drei NRTIs ist eine Kombination aus NNRTI und zwei bzw. drei NRTIs signifikant überlegen (Gulick 2004). In den Folgejahren kamen immer wieder neue Substanzen auf den Markt, zusätzlich konnten die Zahl der Tabletten verringert und die Einnahmemodalitäten vereinfacht werden. Mit Atripla® wurde 2007 das erste Once-daily-Präparat in Europa zugelassen, welches eine Wirkstoffkombination aus drei Substanzen in einer Tablette enthält; so muss nur eine Tablette pro Tag eingenommen werden. Es scheint mittlerweile möglich, die HIV-Infektion lebenslang zu kontrollieren. Eine Eradikation, also vollständige Elimination von HIV aus dem Körper, ist bis auf weiteres aber nicht in Aussicht (Siliciano 2003). Probleme bereiten Nebenwirkungen wie Lipodystrophie und mitochondriale Toxizität (Brinkman 1999), Diabetes mellitus und viele andere. Vor dem Hintergrund einer lebenslangen Therapie stellen die Nebenwirkungen eine große Belastung für die Patienten dar, einige Langzeitnebenwirkungen sind möglicherweise noch gar nicht bekannt.

In den letzten Jahren sind noch zwei weitere Substanzklassen hinzugekommen: die Entry-Inhibitoren, darunter Corezeptorantagonisten und Fusionsinhibitoren, sowie die Integrase-Inhibitoren. Somit sind derzeit fünf verschiedene Wirkstoffklassen mit vielen Substanzen zur Therapie der HIV-Infektion verfügbar.

### **1.3.2 Nukleosidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren (NRTI)**

NRTI sind geringfügig an der Ribose modifizierte Nukleoside, die als „falsche“ Substrate der Reversen Transkriptase von dieser in Konkurrenz mit den physiologischen Nukleosiden in den bei der reversen Transkription entstehenden DNA-Strang eingebaut werden. Das führt zu Instabilitäten im Aufbau des DNA-Doppelstrangs, zum Kettenabbruch und so zum Stopp der DNA-Synthese.

Die wichtigsten Nebenwirkungen dieser Klasse sind zu Beginn der Behandlung gastrointestinale Beschwerden, Kopfschmerz und Müdigkeit. Relevanter sind die Langzeitnebenwirkungen: Es kann zu Pankreatitiden, Polyneuropathie, Myelotoxizität, Lactatazidosen, Lipodystrophie und anderen metabolischen Störungen kommen (Mallal 2000; Galli 2002).

### **1.3.3 Protease-Inhibitoren (PI)**

PI blockieren das aktive Zentrum der HIV-eigenen Protease und verhindern so die Aufspaltung der großen HIV-Präkursorproteine in ihre funktionellen Bestandteile. Dadurch entstehen nicht infektiöse Viruspartikel.

Bedeutende Nebenwirkungen sind gastrointestinaler Art, und im Verlauf kann es zur Lipodystrophie kommen. Häufig sind metabolische Störungen wie Diabetes mellitus sowie Hyper- und Dyslipidämien (Carr 1998). PI können eine Verlängerung der QT-Zeit bewirken, was die Gefahr von Torsades des Pointes erhöht (Anson 2005). Es ist umstritten, ob auch sexuelle Dysfunktionen auf die Wirkung der PI zurückzuführen sind (Collazos 2007).

### **1.3.4 Entry-Inhibitoren**

Bei den Entry-Inhibitoren sind von den zugelassenen Substanzen zwei Klassen zu unterscheiden.

Corezeptorantagonisten blockieren den CCR5-Rezeptor und verhindern so, dass HI-Viren, die einen Tropismus für CCR5 besitzen, sogenannte R5-trope Viren, an ihre



Zielzellen andocken können. Dabei führen Corezeptorantagonisten durch ihre Bindung in einer transmembranen Tasche zu einer Konformationsänderung des CCR5-Rezeptors, welche eine Bindung des viralen gp120 unmöglich macht. Das Nebenwirkungsprofil ist tolerabel (Fadel 2007), am häufigsten wurde in klinischen Studien berichtet über Infektionen der Atemwege, gastrointestinale Beschwerden, Myalgien, Müdigkeit und Schlaflosigkeit (Lieberman-Blum 2008).

Fusionsinhibitoren binden an die während der Fusion von Virus und Zelle durchlaufene Intermediärstruktur des gp41. Damit wird die Fusion verhindert. Wegen der Größe des Peptides von 36 Aminosäuren muss Enfuvirtide zweimal täglich subcutan injiziert werden. Gravierende Nebenwirkung und häufig Grund für den Abbruch der Behandlung sind teils sehr schmerzhaft lokale Reaktionen an der Einstichstelle (Reynes 2007). Zusätzlich wurde von gehäuft auftretenden bakteriellen Pneumonien und Lymphadenopathien berichtet, die auf eine Bindung des Fusionsinhibitors Enfuvirtide an Granulozyten zurückgeführt werden (Trottier 2005).

### **1.3.5 Integrase-Inhibitoren**

Von vier Schritten, die zur Integration der viralen DNA in das Wirtsgenom nötig sind, ist die Inhibition des Strangtransfers die bereits derzeit realisierte Möglichkeit, die Integrase zu hemmen. Beim Strangtransfer dockt die virale DNA katalysiert durch die Integrase mit ihren Hydroxylenden an die Phosphodiesterbrücken der Wirts-DNA an und bindet irreversibel. Ein Strangtransfer-Inhibitor (STI) verhindert diesen Vorgang (Lataillade 2006).

Wegen der kurzen Zeit seit Zulassung sind Daten über Langzeitnebenwirkungen noch nicht vorhanden. Bemerkenswert ist, dass kurzfristig keine spezifischen Nebenwirkungen zu berichten sind.

### **1.3.6 Nicht nukleosidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren (NNRTI)**

NNRTI hemmen wie die NRTI die Reverse Transkriptase (RT), sind allerdings keine falschen Substrate, sondern binden direkt und nicht-kompetitiv in der Nähe der Substratbindungsstelle. Der entstehende Komplex bewirkt durch die Blockade einer katalytisch aktiven Bindungsstelle der RT eine Verminderung der Polymerisationsgeschwindigkeit. Dies hemmt die Replikation neuer Virionen deutlich.

In Deutschland sind zurzeit Efavirenz (EFV) und Nevirapin (NVP) zugelassen. EFV und NVP sind nach den Ergebnissen der Double Non-Nucleoside Study (2NN) gleichwertig, was die virologische Wirkung angeht (van Leth 2004). NVP ist hepatotoxisch und führt in 20% der Fälle zu einem Exanthem. Da die vorliegende Arbeit sich mit Efavirenz beschäftigt, wird diese Substanz im Folgenden ausführlicher beschrieben.

Efavirenz (EFV, Sustiva®) zeichnet sich typischerweise durch ZNS-Nebenwirkungen aus. Darunter fallen leichtere Beschwerden wie Benommenheit, Schwindel, Konzentrationsstörungen, Schlaflosigkeit und lebhafte Träume bis hin zu Alpträumen, zusätzlich kommen Nervosität und Reizbarkeit vor. Die Schlafarchitektur ist gestört, die Schlaflatenz erhöht und die Tiefschlafphasen verkürzt (Gallego 2004). Die Symptome sind im ersten Monat nach Therapiestart am ausgeprägtesten und nehmen meistens im Verlauf ab; allerdings persistieren sie in etwa 10% der Fälle auch 6 Monate nach Therapiebeginn noch (Fumaz 2002), sind aber laut Fumaz meist mild und werden vom Patienten toleriert (Fumaz 2005). Lochet hingegen zeigt in einer dreimonatigen Studie auf, dass etwa 13% der Patienten während des Studienzeitraums Suizidgedanken hatten gegenüber ca. 6% vor Initiierung der Therapie, und dass in 23% der Fälle auch 3 Monate nach Beginn der Behandlung noch moderate bis schwere neuropsychiatrische Beschwerden bestanden (Lochet 2003). Als gravierendere ZNS-Störungen wurden Psychosen (de la Garza 2001), Katatonie (Sabato 2002), Stupor, Depressionen, Halluzinationen und Amnesien beschrieben (Boly 2006). Marzolini und Gutiérrez zeigten, dass die Intensität der ZNS-Nebenwirkungen mit der Höhe des EFV-Plasmaspiegels korreliert (Marzolini 2001; Gutiérrez 2005), wenn auch andere Autoren diesen Zusammenhang nicht fanden (Fumaz 2005). Die Höhe des EFV-Plasmaspiegels hängt unter anderem auch von genetischen Faktoren ab (Haas 2004). Unter EFV kommt es in etwa 6% der Fälle zu einem Exanthem (Perez-Molina 2002). Das Auftreten einer durchaus schmerzhaften Gynäkomastie ist charakteristisch für EFV (Rahim 2004). Das Lipidprofil wird durch EFV ungünstig beeinflusst, der LDL-Serumspiegel ist gegenüber einer Behandlung mit NVP erhöht (Parianti 2007). Bei Umstellung von EFV auf NVP sinken Triglyceride, Gesamt- und LDL-Cholesterin im Serum, während das HDL-Cholesterin ansteigt (Ward 2006). EFV wirkt teratogen und sollte daher in der Schwangerschaft durch NVP ersetzt werden.

### **1.3.6.1. Pharmakokinetik von EFV**

EFV wird einmal täglich in einer Dosis von 600 mg verabreicht. Die orale Einnahme erfolgt zur Nacht, damit der Patient die ZNS-Nebenwirkungen möglichst verschläft. Die maximalen Plasmaspiegel von EFV steigen bei Einnahme mit fettreicher Nahrung um 79% gegenüber dem Nüchternzustand an. Daher sollte EFV am besten nüchtern eingenommen werden. EFV ist zu über 99% an Plasmaproteine, vorwiegend Albumin, gebunden. Im Steady-State, der nach 6 bis 7 Tagen erreicht wird, beträgt die minimale Plasmakonzentration im Mittel  $5,6 \pm 3,2 \mu\text{M}$ . Im Liquor cerebrospinalis beträgt die durchschnittliche EFV-Konzentration 0,69% der Plasmakonzentration. Dies entspricht dem dreifachen der nicht an Plasmaproteine gebundenen, freien Fraktion von EFV im Plasma.

EFV wird in der Leber größtenteils durch die Enzyme CYP2B6 und CYP3A4 metabolisiert. Die hydroxylierten Metaboliten 8-Hydroxy-EFV und 8,14-Dihydroxy-EFV sind biologisch inaktiv und werden glucuronidiert. EFV wird überwiegend biliär sezerniert und unterliegt dem enterohepatischen Kreislauf. 14 – 34% der Substanz wird mit dem Urin ausgeschieden, davon weniger als 1% unverändert. EFV hemmt CYP2C9, CYP2C19 und CYP3A4; es induziert CYP3A4 und führt so zu einem beschleunigten Abbau seiner selbst. Die Plasmahalbwertszeit sinkt von 52-76h nach Einmalgabe auf 40-55h nach Mehrfachgabe. Als Induktor von CYP3A4 führt EFV auch zum beschleunigten Abbau verschiedener Substanzen wie Protease-Inhibitoren und Clarithromycin. EFV wird beschleunigt abgebaut bei zusätzlicher Gabe von Hypericum-Präparaten und Rifampicin (Squibb 2008).

### **1.3.6.2. Pharmakogenetik von EFV**

EFV wird hauptsächlich durch das Cytochrom P450-Isoenzym 2B6 (CYP2B6) metabolisiert (Ward 2003). CYP2B6 weist in vitro eine hohe Variabilität bezüglich Expression und Aktivität auf (Code 1997; Ekins 1998; Chang 2003), die wahrscheinlich auf induzierende und inhibierende Substanzen einerseits und andererseits auf eine hohe genetische Variabilität von CYP2B6, auf sogenannte genetische Polymorphismen, zurückzuführen ist (Ariyoshi 2001; Lang 2001). Als Polymorphismus wird eine genetische Variation bezeichnet, die eine Frequenz von mindestens 1% in der Population aufweist; unterhalb von 1% spricht man von Mutation. In der Basensequenz der genetischen Grundlage von CYP2B6 kommen SNPs (single nucleotide polymorphisms) vor; das sind Austausch einzelner

Nucleotide, die zu einer veränderten Aminosäuresequenz führen können. Die so entstehenden Allele von CYP2B6 werden nach dem Muster CYP2B6\*X mit Nummern versehen. Sie können sich auch aus einer Kombination verschiedener SNPs zusammensetzen. Die zwei Allele von CYP2B6 bilden in Kombination jeweils den Genotyp. Bis zum Jahr 2009 sind 29 Allele klassifiziert worden (cypalleles.ki.se 2009). Unter anderem wurden die SNPs G516T und C1459T beschrieben; G516T führt zu einem Ersatz von Glutamin durch Histidin, C1459T zu einem Ersatz von Arginin durch Cystein im entstehenden Protein. C1459T führt zu einer reduzierten Proteinexpression und Aktivität von CYP2B6. Für G516T waren Proteinexpression und Aktivität von CYP2B6 zwar nicht signifikant erniedrigt (Lang 2001), es wurde jedoch gezeigt, dass G516T zu erhöhten EFV-Plasmaspiegeln führt (Rodriguez-Nova 2005). Rotger wies nach, dass ein homozygoter SNP 516TT mit einer erhöhten intrazellulären EFV-Konzentration sowie mit erhöhten EFV- und NVP-Plasmaspiegeln assoziiert und ein Prädiktor für Neurotoxizität unter EFV-Therapie ist (Rotger 2005). 516TT ist unter Afroamerikanern mit einer Frequenz von 20% weitaus häufiger als unter Kaukasiern mit 3% (Haas 2004). Eine EFV-Dosisreduktion ist bei Trägern von G516T sinnvoll und reduziert die Neurotoxizität von EFV (Gatanaga 2007).

In afrikanischen Populationen findet sich zusätzlich der SNP T983C (Mehlotra 2007), der zu einem Austausch von Isoleucin durch Threonin und damit zu einer erniedrigten Proteinexpression und Aktivität von CYP2B6 führt. T983C ergibt ein nicht funktionelles Produkt, wahrscheinlich ein Null-Allel (Klein 2005). In kaukasischen Populationen ist dieser SNP nicht zu finden (Wang 2006). Wyen hat gezeigt, dass die Plasmakonzentrationen von EFV und NVP signifikant erhöht sind bei Vorliegen der SNPs G516T und T983C, nicht aber C1459T. Zusätzlich wurden Patienten beschrieben, die wegen extrem hoher EFV-Plasmaspiegel und Neurotoxizität die Therapie mit EFV abgebrochen hatten. Beide Patienten wiesen homozygot 983CC auf (Wyen 2008).

Eine wichtige Rolle für die Metabolisierung von EFV könnten auch die Rezeptoren CAR (constitutive androstane receptor) und PXR (pregnane X receptor, auch steroid X receptor, SXR, genannt) spielen. Dabei handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, welche durch Bindung ihrer Liganden aktiviert werden. Da zum Zeitpunkt ihrer Entdeckung diese Liganden noch nicht bekannt waren, wurden sie als orphan, zu deutsch verwaist, bezeichnet. Die Aktivierung führt über eine Bindung an den

jeweiligen Promotor zu einer Induktion von CYP2B bzw. CYP3A (Goodwin 2001; Chang 2003). PXR und CAR besitzen beide eine doppelte Zinkfinger-DNA-Bindungsdomäne (DBD) und eine carboxyterminale Liganden-Bindungsdomäne (LBD) (Willson 2002).

PXR befindet sich im Zellkern und reguliert als Transkriptionsfaktor hauptsächlich die Expression von CYP3A (Quattrochi 2001); zur Gen-Induktion bildet PXR mit dem Retinoid X Receptor (RXR) ein Heterodimer, welches an den Promotor von CYP3A bindet. CAR ist im Zytosol angesiedelt und wird bei Bindung eines Liganden in den Zellkern transloziert, um dort wie PXR ein Heterodimer mit RXR zu bilden und den Promotor zu aktivieren. CAR reguliert in erster Linie die Expression von CYP2B (Willson 2002). Es wurde aber gezeigt, dass sowohl PXR als auch CAR in der Lage sind, die Promotoren von CYP3A und CYP2B zu aktivieren (Xie 2000), und dass PXR CYP2B6 auf direktem Weg zu regulieren in der Lage ist (Goodwin 2001). Somit ist neben CAR auch PXR möglicherweise von Relevanz für die Metabolisierung von EFV.

Auch hier wurden SNPs entdeckt, welche die Funktionalität von PXR bzw. CAR und damit indirekt auch die Aktivität von CYP3A bzw. CYP2B beeinflussen könnten (Ikeda 2003; Ikeda 2005).

CAR C540T führt nicht zu einem Aminosäuren-Austausch und wird daher als silente Mutation betrachtet (Ikeda 2003). Allerdings konnte Jinno zeigen, dass C540T alternative Splice-Varianten ergibt, welche eine reduzierte Aktivierung der jeweiligen Promotoren zum Beispiel von CYP3A und CYP2B sowie eine verminderte Translokation von CAR aus dem Zytosol in den Zellkern zur Folge haben (Jinno 2004). Wie genau CAR C540T CYP2B6 beeinflusst, ist derzeit noch nicht bekannt.

PXR T44477C befindet sich in der 5'-untranslatierten (5'-UTR) Promotor-Region von PXR; er führt zum Verlust einer Bindungsstelle für die sogenannten signal transducer and activator of transcription (STAT) 1, 3 und 6 sowie Helios-A, ein Mitglied der Ikaros-Gen-Familie, und den nuclear factor of activated T cells (NFAT). Bei Frauen, die 44477TT aufwiesen, war die Testosteron-6 $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität als Maß für die CYP3A4-Aktivität signifikant erhöht gegenüber 44477CC ( $p=0,037$ ), und die Menge der CYP3A4-mRNA war tendenziell geringer. Hepatozyten mit 44477TT zeigten basal mehr CYP3A4, wiesen aber eine geringere Rifampicin-vermittelte Induktion von CYP3A4 auf (Lamba 2008). Dies spricht für eine verminderte Funktionalität von PXR 44477TT.

PXR C63396T befindet sich im Intron 1b, an einer Bindungsstelle für den hepatocyte nuclear factor 3 $\beta$  (HNF3 $\beta$ ), welcher zusammen mit HNF1 und HNF4 vermutlich die Transkriptionsaktivität des PXR-Promotors reguliert (Gibson 2006). Es ist denkbar, dass bei einer verschlechterten Bindung dieser Faktoren an den PXR-Promotor die Transkriptionsaktivität desselben beeinträchtigt ist. Personen mit 63396TT wiesen zwar eine erhöhte basale CYP3A4-Aktivität gegenüber 63396CT bzw. CC auf, und die Menge der PXR-mRNA war bei C63396T auch tendenziell größer als bei 63396CC. Allerdings war die Induzierbarkeit von CYP3A4 bei Vorliegen von 63396C mit einem Faktor von  $16,46 \pm 3,1$  gegenüber  $9,26 \pm 6,1$  bei 63396TT signifikant größer (Lamba 2008).

PXR A7635G liegt im Intron 5. Bei Zhang war dieser SNP gegenüber dem Wildtyp-Allel mit einer größeren Induzierbarkeit des intestinalen CYP3A durch Rifampicin assoziiert (Zhang 2001).

#### **1.4 Fragestellung der vorliegenden Arbeit**

In der vorliegenden Arbeit vorangehenden Pharmacogenetics-Studie von Wyen wurde die Frequenz der SNPs G516T, T983C und T1459C vergleichend bestimmt in 146 afrikanischen und 225 kaukasischen Individuen, die seit mindestens drei Monaten eine Therapie mit Efavirenz oder Nevirapin einnahmen. Außerdem wurden die Plasmakonzentrationen von Efavirenz bzw. Nevirapin bestimmt. In einer multivariaten Analyse wurden die Medikamenten-Plasmaspiegel in Abhängigkeit des Nachweises der oben genannten SNPs verglichen. Dabei waren sowohl die Efavirenz- als auch die Nevirapin-Plasmakonzentrationen signifikant erhöht bei Vorliegen von G516T und T983C, aber nicht bei C1459T. Bei zwei afrikanischen Patienten wurde erstmals die homozygote Variante 983CC nachgewiesen; diese Patienten hatten im Median einen etwa zehnfach höheren Efavirenz-Plasmaspiegel von 23418 ng/ml gegenüber 2068 bzw. 2076 ng/ml bei 983TT bzw. 983CT. Außerdem brachen beide Patienten wegen zentralnervöser Toxizität die Therapie mit Efavirenz innerhalb einer Woche nach Abnahme der Blutproben ab (Wyen 2008).

In der vorliegenden Arbeit, die Teil der GenTox-Studie ist, sollte überprüft werden, ob Nebenwirkungen, die zum Abbruch der Therapie mit Efavirenz führen, mit einer erhöhten Frequenz der SNPs G516T und T983C assoziiert sind, welche mit einer signifikanten Erhöhung der Plasmakonzentration von Efavirenz einhergehen. Es wurden Patienten aus dem Deutschen Kompetenznetz HIV/AIDS rekrutiert, die mit

EFV behandelt worden waren. Dabei wurden Patienten, welche die Therapie mit dieser Substanz wegen Nebenwirkungen abgebrochen hatten, Patienten unter einer dauerhaften EFV-Therapie gegenübergestellt. Zusätzlich wurden die Patienten nach ihrer ethnische Zugehörigkeit (kaukasisch oder schwarzafrikanisch / afroamerikanisch) unterteilt. Es sollte analysiert werden, ob sich in diesen Gruppen Unterschiede ergeben hinsichtlich der Häufigkeit von G516T und T983C. So sollte überprüft werden, ob Nebenwirkungen unter EFV-Therapie mit SNPs im CYP2B6 erklärt werden können. Weiterhin sollte auch für die SNPs C540T in CAR und die SNPs T44477C, C63396T und A7635G in PXR untersucht werden, ob ein Zusammenhang mit der Häufigkeit eines EFV-Therapieabbruchs wegen Nebenwirkungen gegeben ist.

## 2 Material & Methodik

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Substanzen

Folgende Substanzen bzw. Produkte wurden bei der Analyse verwendet:

Tabelle 2.1: Verwendete Substanzen

Produkt	Firma	Artikelnummer
ABsolute™ QPCR Mixes	ABgene House (Surrey, UK)	AB-1133/b
AmpliTaq Gold® DNA-Polymerase (12x250 Einheiten mit Puffer II und MgCl <sub>2</sub> - Lösung)	Applied Biosystems Inc. (Foster City, California, USA)	N8080245
GeneAmp® dNTP Blend (10mM)	Applied Biosystems Inc. (Foster City, California, USA)	N8080260
Ethanol 100%	VWR Laboratory Supplies (Poole, UK)	
MJ White 96-Loch-Platte	MJ Research Inc. (Waltham, Massachusetts, USA)	
QIAamp DNA Blood Mini Kit (250)	QIAGEN Ltd. (West Sussex, UK)	51106
Quant-iT™ Picogreen® dsDNA Reagent and Kits	Molecular Probes™ (Paisley, UK)	P7581
Roche Human Genomic DNA	Roche Applied Science (Burgess Hill, UK)	Cat. No. 11691112001
Sequence Detection Primer (10.000 pmol)	Applied Biosystems Inc. (Foster City, California, USA)	4304970
TaqMan® MGB Probe (6.000 pmol)	Applied Biosystems Inc. (Foster City, California, USA)	4316034
Virkon		
Wasser (RNAse-frei)	Sigma (Poole, UK)	W4502



## 2.1.2 Ausrüstung

Folgende Geräte wurden zur Analyse verwendet:

Tabelle 2.2: Verwendete Geräte

Gerät	Firma
Autoklav	
Chromo 4	Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, California, USA)
DNA Engine Opticon® 2 (Continuous Fluorescence Detection System)	Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, California, USA)
Elga Option 4 Water Purifier	ELGA LabWater (Marlow, UK)
Eppendorf® Mastercycler® gradient	Eppendorf UK Ltd. (Cambridge, UK)
GeneAmp® PCR System 9700 (Base Module)	Applied Biosystems Inc. (Foster City, California, USA)
Wasserbad	

## 2.2 Methodik

### 2.2.1 Patientenkollektiv

Die Ethikkommission und das Steering-Komitee des Deutschen Kompetenznetzes HIV/AIDS erteilte die Genehmigung zur Durchführung der Studie. Die Blutproben von 541 Patienten wurden durch das Deutsche Kompetenznetz HIV/AIDS zur Verfügung gestellt. Folgende Kriterien wurden bei der Auswahl der Patienten berücksichtigt:

#### a) Einschlusskriterien

- Mindestalter 18 Jahre, männliches oder weibliches Geschlecht,
- afrikanische oder kaukasische Herkunft,
- gesicherte HIV-Infektion,
- Patienten, die eine Therapie mit Efavirenz abgebrochen haben (Studiengruppe), sowie Patienten, die unter Therapie mit Efavirenz keine Nebenwirkungen haben (Kontrollgruppe),
- normales Körpergewicht (Body Mass Index 19 – 27 kg/m<sup>2</sup>).

#### b) Ausschlusskriterien

- weder afrikanischer noch kaukasischer Abstammung,
- Einnahme von Medikamenten neben Efavirenz, welche die Aktivität von CYP2B6 inhibieren oder induzieren (siehe Tabelle 2.3),

- aktuelle oder zurückliegende Erkrankungen, welche die Ziele oder die Durchführung dieser Studie behindern,
- akute oder chronische Erkrankungen, welche Absorption und / oder Stoffwechsel beeinflussen,
- Drogen- oder Alkoholabhängigkeit,
- zurückliegender Alkoholkonsum von mehr als 50g pro Tag.

Tabelle 2.3: Substanzen, welche die Aktivität von CYP2B6 beeinflussen

Induktion von CYP2B6	Inhibition von CYP2B6
Ticlopidin	17 $\alpha$ -Ethinylestradiol
Orphenadrin	Carbamazepin
	Clopidogrel
	Phenobarbital
	Rifampicin
	Thiotepa

Soweit vorhanden, wurden folgende Patientendaten erhoben:

- Allgemeine Daten wie Alter, Geschlecht und ethnische Abstammung,
- HIV-Erstdiagnose und Infektionsmodus,
- CD4-Zellzahl pro Mikroliter und Viruslast in Kopien pro Mililiter, außerdem CDC-Stadium sowie Alanin-Aminotransferase (ALT) und Aspartat-Aminotransferase (AST) als Parameter der Leberfunktion; bei Patienten der Studiengruppe zur Zeit des Therapieabbruchs, bei Patienten der Kontrollgruppe die aktuellsten erhältlichen Werte,
- Startdatum der EFV-Therapie,
- Weitere Bestandteile des antiretroviralen Therapieregimes und sonstige Komedikation während der Therapie mit EFV,
- Grund und Datum des EFV-Therapieabbruchs bei Patienten der Studiengruppe,
- Interkurrente Hepatitis, akut oder chronisch, zum Zeitpunkt des Therapieabbruchs bei Patienten der Studiengruppe.

## **2.2.2 Untersuchungsmaterial**

Als Untersuchungsmaterial diente EDTA-Vollblut, welches vom Deutschen Kompetenznetz HIV/AIDS zur Verfügung gestellt wurde.

Nach zentraler Sammlung der Proben in Bochum wurden sie auf Trockeneis an die Liverpool HIV Pharmacology Group des Department Of Pharmacology And Therapeutics der University Of Liverpool versandt. Dort wurden sie bis zur weiteren Verarbeitung in einem isolierten Labor für infektiöse Blutproben bei -80°C gelagert. Die Laborarbeiten zur vorliegenden Arbeit wurden in Kooperation mit der University Of Liverpool durchgeführt.

## **2.2.3 Ermittlung der SNPs**

### **2.2.3.1. DNA-Extraktion**

Mit Hilfe des QIAamp DNA Blood Mini Kit wurde die gesamte genomische DNA (gDNA) aus den einzelnen EDTA-Blutproben extrahiert. Dabei wurden jeweils 200 µl Vollblut benötigt. Statt EDTA-Blut kann auch Citrat- oder Heparin-Vollblut verwendet werden.

Die Blutproben wurden aufgetaut und auf Raumtemperatur (15-25°C) erwärmt. Für die Lyse wurde ein Heizblock oder ein Wasserbad auf 56°C vorgeheizt. Die benötigten Reagentien wurden entsprechend der Anleitung des QIAamp DNA Blood Mini Kit vorbereitet bzw. zur Verfügung gestellt: Qiagen-Protease, 96-100%iges Ethanol, Lysepuffer (Buffer AL), Buffer AE, Buffer AW1 und Buffer AW2. Je Probe benötigt man zwei 1,5 ml-Eppendorfgefäße und vier 2 ml-Sammelgefäße.

Die DNA-Extraktion wird bei Raumtemperatur durchgeführt und geht wie folgt vonstatten: Zunächst werden 20 µl der QIAGEN-Protease in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß pipettiert, gefolgt von 200 µl EDTA-Vollblut aus der Probe sowie 200 µl Lyse-Puffer (Buffer AL). Keinesfalls soll die QIAGEN-Protease direkt zum Lyse-Puffer gegeben werden. Der Ansatz wird auf einem Vortex für 15s durchmischt und anschließend für 10min bei 56°C in einem Heizblock oder einem Wasserbad inkubiert. Die QIAGEN-Protease spaltet Peptidbindungen und führt so zur Lyse der Blutzellen, eine zur Extraktion der DNA notwendige Voraussetzung. Da auch Peptidbindungen vorhandener HI-Viren gespalten werden, ist nach der Lyse davon auszugehen, dass die Flüssigkeit nicht mehr infektiös ist. Durch kurzes Abzentrifugieren werden Tropfen an der Unterseite des Deckels eingesammelt, um ein Verspritzen von Flüssigkeit beim Öffnen des Deckels und eine Kontamination

anderer Proben zu vermeiden. Es werden 200 µl Ethanol zum Ansatz hinzugefügt, für 15s auf einem Vortex gemischt und dann kurz abzentrifugiert. Die Mischung wird vorsichtig auf eine in ein 2 ml- Sammelgefäß (Collection Tube) gesetzte QIAamp-Spinsäule pipettiert, ohne den oberen Rand mit Flüssigkeit zu kontaminieren; das 1,5 ml-Eppendorfgefäß wird verworfen. Alle Spinsäulen müssen während der einzelnen Zentrifugationsschritte verschlossen sein, um Aerosolbildung zu vermeiden. Die QIAamp-Spinsäule wird eine Minute bei 6000 x g bzw. 8000 rpm (rounds per minute) zentrifugiert und anschließend auf ein neues 2 ml-Sammelgefäß gesetzt. Das erste 2 ml-Sammelgefäß wird samt Filtrat verworfen. Nach vorsichtiger Zugabe von 500 µl Waschpuffer 1 (Buffer AW1) wird erneut eine Minute mit 6000 x g bzw. 8000 rpm zentrifugiert, die Spinsäule auf ein neues 2 ml-Sammelgefäß gesetzt und das andere verworfen. Es werden 500 µl Waschpuffer 2 (Buffer AW2) auf die Spinsäule pipettiert, die dann für 3min bei maximaler Geschwindigkeit, mindestens 20.000 x g bzw. 14.000 rpm, zentrifugiert wird. Um Buffer AW2 komplett aus der Spinsäule zu entfernen, ist es ratsam, nach Wechseln des 2 ml-Sammelgefäßes einen weiteren Zentrifugationsschritt von einer Minute bei maximaler Drehzahl anzuschließen. Reste von Buffer AW2 können die Verwendung der gewonnenen DNA zum Beispiel bei einer PCR (Polymerase-Kettenreaktion) beeinträchtigen. Die Spinsäule wird auf ein neues 1,5 ml-Eppendorfgefäß gesetzt; nach Zugabe von 50 µl Elutionspuffer (Buffer AE) und dreiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird eine Minute mit 6000 x g bzw. 8000 rpm zentrifugiert (Handbuch für QIAamp® DNA Mini Kits und QIAamp DNA Blood Mini Kits, 10/2002).

Durch ein vergleichsweise geringes Elutionsvolumen und eine lange Inkubationszeit sollte hier erreicht werden, dass bei variierender Vitalität der Blutzellen möglichst viel gDNA gewonnen wird. Durch photometrische Messung der Nukleinsäure-Konzentration im Eluat via Absorption bei 260 und 280 nm Wellenlänge wird die Reinheit der gewonnenen DNA bestimmt. Der Quotient aus den Absorptionsraten bei 260 und 280 nm, die A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>-Ratio, sollte zwischen 1,7 und 1,9 liegen. Die gewonnene gDNA kann bei 4°C einen Monat aufbewahrt werden, für eine längere Aufbewahrung sollte sie bei -20°C gelagert werden.

### 2.2.3.2. Quantifikation der gDNA

Zur Bestimmung der gDNA-Konzentration im Eluat wurde Quant-iT™ Picogreen® dsDNA Reagent and Kits mit dem fluoreszierenden Cyanin-Farbstoff Picogreen verwendet, der doppelsträngige DNA (dsDNA) bindet und in diesem Komplex ein bestimmtes Muster von Absorption und Fluoreszenz aufweist. Dieses Muster wurde mittels DNA Engine Opticon® 2 registriert.

25 µl Picogreen-Stammlösung wird mit 5 ml RNase-freiem H<sub>2</sub>O im Verhältnis 1:200 verdünnt. Da Picogreen durch Licht abgebaut wird, sollte eine hergestellte Verdünnungslösung dunkel gelagert und möglichst rasch verwendet werden. Sie kann bei 4°C unter Lichtabschluss maximal eine Woche gelagert werden.

Es werden jeweils 2 µl Eluat und 50 µl der Picogreen-Verdünnung pro Loch in eine MJ White 96-Lochplatte pipettiert. Zusätzlich wird eine zweifache Standardkurve angelegt. Dabei verdünnt man eine bekannte DNA-Konzentration von 200 ng/µl schrittweise im Verhältnis 1:2, so dass sich die Standardkurve aus den in Tabelle 2.4 gezeigten Konzentrationen zusammensetzt. Jede Verdünnungsstufe wird jeweils in zwei Löcher pipettiert.

Tabelle 2.4: DNA-Konzentrationen der Standardkurve

DNA-Konzentration
200 ng/µl
100 ng/µl
50 ng/µl
25 ng/µl
12,5 ng/µl
6,25 ng/µl
3,125 ng/µl
1,5625 ng/µl

Als Negativkontrolle wird reines Wasser ohne DNA eingesetzt, um die Hintergrundfluoreszenz zu erfassen. Die MJ White 96-Lochplatte wird versiegelt, kurz abzentrifugiert und bei 20°C für 30s im RT-PCR Opticon Monitor 2.0 inkubiert, der nach 30s die Fluoreszenz in den einzelnen Löchern registriert. Der aus den zwei Messungen je Verdünnung des DNA-Standards gebildete Durchschnitt wird in einem Graphen eingetragen, dessen Abszisse die DNA-Konzentration und dessen Ordinate die Intensität der Fluoreszenz beschreibt. Die Punkte sollten idealerweise auf einer Geraden liegen. Damit kann eine Gleichung der Form  $y = ax + b$  ermittelt werden, welche die Regression der DNA-Konzentration (y) auf die gemessene Fluoreszenz

(x) beschreibt. Der Wert von  $R^2$  zeigt das Ausmaß der Regression an; er sollte möglichst nahe 1 liegen, was einer perfekten Regression entspräche. Anhand der Gleichung ist es möglich, die unbekanntes DNA-Konzentrationen der einzelnen Proben aus der registrierten Fluoreszenz zu berechnen. Grob abweichende Punkte können von der Berechnung der Standardkurve ausgenommen werden; es müssen allerdings sechs Werte Eingang finden.

Nach Ermittlung der DNA-Konzentrationen in den einzelnen Proben wurden diese für das weitere Vorgehen einheitlich auf 20 ng/µl verdünnt.

### **2.2.3.3. PCR**

Für die SNPs G516T und T983C wurden die in Frage kommenden Exons, Exon 4 für G516T sowie die Exons 7 & 8 für T983C, zunächst mittels PCR (polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion) vervielfältigt, um die Erkennung der SNPs zu verbessern. Für die SNPs CAR C540T (rs2307424), PXR T44477C (rs1523130), PXR C63396T (rs2472677) und PXR A7635G (rs6785049) war dieser Schritt nicht notwendig.

Bei der PCR kommt eine DNA-Polymerase zum Einsatz. Die PCR läuft in einem Thermocycler in Zyklen ab, die aus jeweils drei Schritten bestehen.

Zunächst wird die doppelsträngig vorliegende DNA bei 94-96°C zum Schmelzen gebracht. Die Wasserstoffbrücken-Bindungen werden gebrochen, und der Doppelstrang zerfällt in zwei Einzelstränge. Dieser Vorgang wird als Denaturierung bezeichnet.

Die DNA-Polymerase vervielfältigt nur DNA-Abschnitte, die durch Primer gekennzeichnet sind. Primer sind Oligonukleotide einer Länge von etwa 10 bis 20 Nukleotiden, die spezifisch für die zu vervielfältigte Sequenz hergestellt werden. Die Primer benötigt die DNA-Polymerase als Startpunkt für die Synthese eines komplementären DNA-Strangs. Im zweiten, etwa 30s dauernden Schritt eines PCR-Zyklus, der Primerhybridisierung, binden die Primer bei Temperaturen zwischen 55 und 65°C komplementär an die gewünschte Sequenz des DNA-Einzelstrangs. Ein zweiter Primer ist so konstruiert, dass er den zweiten, zum ersten Strang komplementären DNA-Einzelstrang bindet.

Im dritten Schritt kopiert die DNA-Polymerase bei etwa 68 bis 72°C die gewünschte DNA-Sequenz, indem sie vom jeweils gebundenen Primer ausgehend diesen

komplementär zum gebundenen DNA-Einzelstrang verlängert. Dieser Schritt wird als Elongation bezeichnet.

Am Ende eines PCR-Zyklus wurde die gewünschte DNA-Sequenz somit unter idealen Bedingungen dupliziert. Indem man eine Anzahl dieser Zyklen hintereinander ablaufen lässt, kann man spezifische DNA-Sequenzen exponentiell vervielfachen.

#### 2.2.3.4. RT-qPCR

Zur Ermittlung der SNPs wurden die in Tabelle 2.5 aufgeführten Sonden und die in Tabelle 2.6 dargestellten Primer verwendet.

Tabelle 2.5: Sonden zur Ermittlung der SNPs

SNP	TaqMan-Sonde
CYP2B6 G516T	FAM: 5'- TTCCATTCCATTACCG -3' VIC: 5'- TTCCAGTCCATTACCG -3'
CYP2B6 T983C	FAM: 5'-CTGTTCAATCTCCC-3' VIC: 5'-CTGTTCAAGTCTCCC-3'
CAR C540T	Sequenzen bei Applied Biosystems Assay-ID: C__25746794_20
PXR T44477C	FAM: 5'-ATATTGGAAAGGAAAAG-3' VIC: 5'-ATATTGGAAAGAAAAG-3'
PXR C63396T	FAM: 5'-CCATATTTTTTTTGTATTA-3' VIC: 5'-CCATATTTTTTCTGATTA-3'
PXR A7635G	Sequenzen bei Applied Biosystems Assay-ID: C__29280426_10

Tabelle 7: Primer zur Ermittlung der SNPs

SNP	forward Primer	reverse Primer
CYP2B6 G516T	5'- CTTGACCTGCTGCTTCTTCCTA-3'	5'- AGACGATGGAGCAGATGAT GTTG-3'
CYP2B6 T983C	5'- GCCTGAAATGCCTCTTTAAAATGAGATTC-3'	5'- GCGATGTGGCCAATCAC- 3'
CAR C540T	Sequenzen bei Applied Biosystems Assay-ID: C__25746794_20	
PXR T44477C	5'-CAGGGAGGACCTAGAGTAAGTGA-3'	5'- CTACTTCCACTGGTACTGA AATCCA-3'
PXR C63396T	5'- GCACAAACATTTTCAATTTCAATGAAGTTCA- 3'	5'- CATTCGGAAGACTTATTCTA TTCCTGTCT-3'
PXR A7635G	Sequenzen bei Applied Biosystems Assay-ID: C__29280426_10	

Die RT-qPCR läuft prinzipiell wie die oben beschriebene PCR ab. Es gibt allerdings einen gewichtigen Unterschied. Neben den Primern, die für die Amplifikation der gewünschten DNA-Abschnitte zuständig sind, werden Sonden eingesetzt. Dabei handelt es sich zunächst wie bei Primern um ein Oligonukleotid, welches komplementär zu einem DNA-Abschnitt ist, der erkannt werden soll. An die Sonde ist aber zusätzlich ein Farbstoff gekoppelt, ein sogenanntes Donor-Fluorochrom, das bei Anregung durch Licht einer bestimmten Wellenlänge wiederum in einer anderen Wellenlänge fluoresziert, und ein Akzeptor-Fluorochrom, welches als Quencher bezeichnet wird. Befinden sich Donor und Akzeptor in ausreichender Nähe, wie das bei intakter Sonde der Fall ist, absorbiert der Quencher die Fluoreszenz des Fluorophors. Dieser Vorgang wird als fluorescence resonance energy transfer (FRET) bezeichnet. Bindet die Sonde nun an die gesuchte komplementäre DNA-Sequenz, wird sie bei der Elongation durch die DNA-Polymerase auf Grund der 5'-3'-Exonuklease-Aktivität hydrolytisch zerlegt. Dadurch wächst die Entfernung zwischen Donor-Fluorochrom und Quencher, und bei Anregung kann die Fluoreszenz des Donor-Fluorochroms gemessen werden, da sie nicht mehr durch den Quencher absorbiert wird. Die Fluoreszenz wird durch das DNA Engine Opticon<sup>®</sup> registriert. Die Registrierung der Fluoreszenz hat also zur Voraussetzung, dass die gesuchte DNA-Sequenz vorhanden ist. Zur Erkennung eines SNP werden entsprechend zwei verschiedene Sonden pro SNP mit jeweils unterschiedlichem Farbstoff eingesetzt; je nachdem, ob das Wildtyp-Allel, die mutierte Variante oder aber beides vorliegt, kann nur eine oder aber auch beide Sonden binden und das entsprechende Fluoreszenzsignal wird registriert.

In der vorliegenden Arbeit wurden für die beiden Sonden jeweils 6-FAM-phosphoramidit (FAM) bzw. VIC als Farbstoffe verwendet.

#### **2.2.4 statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung wurde in Kooperation mit der University of Liverpool vorgenommen. Die Genotypen wurden auf das Vorliegen des Hardy-Weinberg-Äquilibrium hin untersucht, indem ein  $\chi^2$ -Test der beobachteten versus der von den Allel-Häufigkeiten vorhergesagten Genotyp-Frequenzen durchgeführt wurde. Mittels SPSS (Version 16) wurde eine univariate und eine multivariate Analyse der erhobenen Variablen durchgeführt; dabei wurde eine binäre logistische Regression



angewandt. Ergab die univariate Analyse eines Parameters einen Wert von  $p \leq 0,15$ , so wurde eine multivariate Analyse durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 *Patientenkollektiv*

Die Blutproben von 541 Patienten wurden durch das Deutsche Kompetenznetz HIV/AIDS zur Verfügung gestellt.

Von den 541 Patienten waren 391 kaukasischer und 150 afrikanischer Herkunft; 390 Patienten waren männlich und 151 weiblich. Das mediane Alter betrug 46 Jahre bei einer Spannweite von 21 bis 82 Jahren. Die CD4-Zellzahl lag median bei 407/ $\mu$ l mit einer Spannweite von 0 bis 3233/ $\mu$ l, die HIV-Viruslast betrug im Median <50 Kopien/ml mit einer Spannweite von <50 bis 1.000.000 Kopien/ml.

410 Patienten wurden seit mindestens drei Monaten mit einer EFV enthaltenden ART behandelt (Kontrollgruppe), während 131 Patienten eine ART, die EFV beinhaltete, innerhalb von drei Monaten nach Beginn abgebrochen hatten (Studiengruppe). Da die Gründe für den Abbruch der Therapie sehr selten dokumentiert waren, entschieden wir uns dafür, einen Abbruch innerhalb von drei Monaten auf das Auftreten von Nebenwirkungen zurückzuführen, während wir für einen späteren Therapieabbruch andere Gründe wie die Entwicklung von Resistenzen postulierten. Alle nachfolgenden Prozentangaben sind auf ganze Zahlen gerundet. Die p-Werte aus der univariaten und der multivariaten Analyse wurden ab einem Wert von 0,05 als signifikant angesehen; p-Werte <0,2 in der univariaten Analyse wurden zusätzlich einer multivariaten Analyse unterzogen.

Tabelle 3.1: Charakteristika des Patientenkollektivs

	Kontrollgruppe	Studiengruppe	insgesamt
Patientenzahl	410	131	541
männliches Geschlecht	286	104	390
kaukasische Herkunft	282	109	391
medianes Alter (Spannweite)	45 (21-81)	47 (28-82)	46 (21-82)
CD4-Zellzahl (Spannweite) / $\mu$ l	449 (12-3233)	325 (0-1260)	407 (0-1260)
HIV-Viruslast (Spannweite) /ml	<50 (<50-800.000)	325 (<50-1.000.000)	<50 (<50-1.000.000)

Tabelle 3.2: Gründe für den Abbruch der EFV-Therapie innerhalb von drei Monaten

Grund für Therapieabbruch	n
Nebenwirkungen	68 (52%)
Patientenwunsch	4 (3%)
Therapieversagen	1 (1%)
unbekannt	58 (44%)
	$\Sigma = 131$ (100%)

### 3.2 Genotypfrequenzen

Unter 531 Patienten fanden sich 250 mit dem Genotyp CYP2B6 516GG (47%), 230 mit dem Genotyp 516GT (43%) sowie 51 mit 516TT (10%).

Von 531 Patienten wiesen 516 den Genotyp CYP2B6 983TT auf (97%), 13 den Genotyp 983TC (2%) und 2 den Genotyp 983CC (<1%).

An 525 Patienten wurde CAR untersucht. Es ergab sich, dass 276 Patienten den Genotyp CAR 540CC hatten (53%), 175 den Genotyp CAR 540CT (33%) und 44 (8%) den Genotyp CAR 540TT.

493 Patienten wurden auf den SNP PXR C63396T untersucht. 99 wiesen 63396CC auf (20%), 240 (49%) 63396CT und 154 (31%) 63396TT.

Bei 373 Patienten wurde der SNP PXR T44477C ermittelt. 114 Patienten zeigten den Genotyp PXR 44477TT (30%), 159 (43%) den Genotyp PXR 44477CT und 100 (27%) den Genotyp 44477CC.

Der SNP PXR A7635G wies folgende Frequenzen unter 372 untersuchten Patienten auf: 98 trugen PXR 7635AA (26%), 153 (41%) den Genotyp PXR 7635AG sowie 121 (33%) PXR 7635GG.

### 3.3 Unterschiede zwischen Kontroll- und Studiengruppe

#### 3.3.1 Ethnische Herkunft

In der Gruppe der Kaukasier führten 282 Patienten (72%) die EFV-Therapie weiter, während 109 (28%) innerhalb von drei Monaten die EFV-Therapie abbrachen. Unter den afrikanischstämmigen Patienten waren dies entsprechend 127 (85%) bzw. 22 (15%) Patienten. Die univariate Analyse ergab einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Kaukasiern und afrikanischstämmigen Patienten ( $p=0,002$ ), der auch in der multivariaten Analyse erhalten blieb ( $p=0,001$ ). Demnach brachen

Afrikanischstämmige bei einer Odds Ratio von 0,4 (0,3-0,7) seltener die Therapie mit EFV vorzeitig ab als Kaukasier.

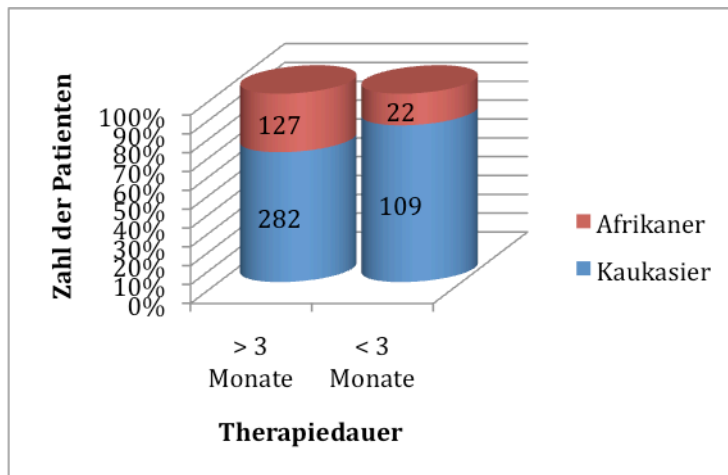


Abbildung 3.1: Ethnische Abstammung

### 3.3.2 Geschlecht

286 männliche Patienten (73%) führten die EFV-Therapie länger als drei Monate durch, 104 (27%) brachen sie innerhalb von drei Monaten ab. Demgegenüber nahmen 123 weibliche Patienten (82%) EFV länger als drei Monate ein, während 27 Frauen (18%) die EFV-Therapie innerhalb von drei Monaten beendeten. In der univariaten Analyse ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen Männern und Frauen ( $p=0,04$ ; Odds Ratio 0,6 [0,4-0,96]), wonach Frauen die EFV-Therapie seltener innerhalb von drei Monaten abbrachen. Dieser Unterschied hielt aber der multivariaten Analyse nicht stand (korrigiertes  $p=0,54$ ).

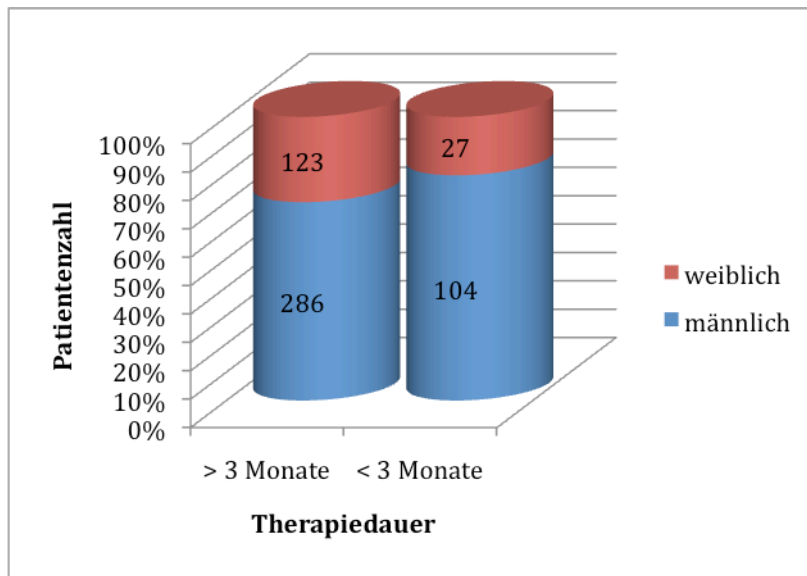


Abbildung 3.2: Geschlecht

### 3.3.3 Alter

Hinsichtlich des Alters ergaben sich zwischen Studien- und Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede. Die p-Werte betragen jeweils 0,12 in der univariaten und 0,75 in der multivariaten Analyse.

### 3.3.4 Genotypen

#### 3.3.4.1. CYP2B6 G516T

In der Kontrollgruppe fanden sich unter 400 Patienten 193 mit dem Genotyp 516GG (48%), 175 (44%) mit dem Genotyp 516GT und 32 (8%) mit 516TT. Demgegenüber wiesen in der Studiengruppe von 131 Patienten 57 den Genotyp 516GG (44%), 55 (42%) den Genotyp 515GT und 19 (15%) den Genotyp 516TT auf. Die Häufigkeit des SNP 516G>T war in der Studiengruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe, sowohl in der univariaten als auch in der multivariaten Analyse ( $p=0,03$  bzw.  $0,007$ ). Die Wahrscheinlichkeit, den SNP 516G>T zu haben, war in der Studiengruppe 2,4fach größer als in der Kontrollgruppe (multivariate Odds Ratio 2,4; 95%-Konfidenzintervall 1,3-4,6).

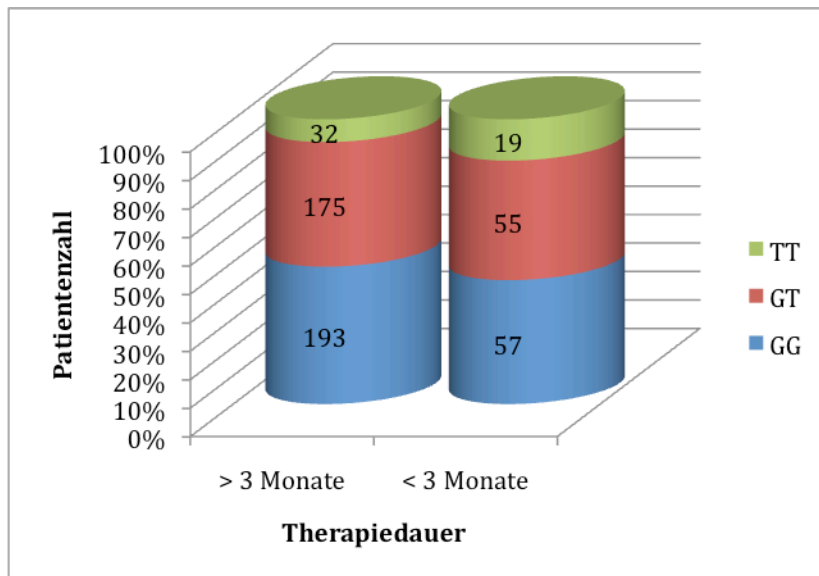


Abbildung 3.3: CYP2B6 G516T

### 3.3.4.2. CYP2B6 T983C

In der Kontrollgruppe hatten von 400 Patienten 386 den Genotyp 983TT (97%), 12 (3%) den Genotyp 983TC und 2 (<1%) den Genotyp 983CC. In der Studiengruppe fanden sich unter 131 Patienten 130 mit dem Genotyp 983TT (99%), 1 Patient mit 983TC (1%) und niemand mit 983CC. Weder in der univariaten noch in der multivariaten Analyse ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Studiengruppe ( $p=0,14$  bzw.  $0,48$ ).

### 3.3.4.3. CAR C540T

In der Kontrollgruppe wiesen von 397 Patienten 202 den Genotyp CAR 540CC auf (51%), 161 (41%) den Genotyp CAR 540CT und 34 (9%) CAR TT. In der Studiengruppe befanden sich unter 128 Patienten 74 mit dem Genotyp CAR 540CC (58%), 44 (34%) mit dem Genotyp CAR 540CT und 10 (8%) mit dem Genotyp CAR 540TT. Während die univariate Analyse keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Kontroll- und Studiengruppe ergab ( $p=0,17$ ; Odds Ratio 0,8 [95%-Konfidenzintervall 0,5-1,1]), erbrachte die multivariate Analyse mit  $p=0,005$  und einer Odds Ratio von 0,5 (95%-Konfidenzintervall 0,3-0,8) einen signifikanten Unterschied dahingehend, dass in der Kontrollgruppe mehr Patienten den Genotyp CAR 540C>T hatten als in der Studiengruppe.

#### 3.3.4.4. PXR T44477C

Bezüglich PXR 44477T>C ergaben sich zwischen Kontroll- und Studiengruppe keine statistisch signifikanten Unterschiede. Die univariate Analyse brachte einen p-Wert von 0,32.

#### 3.3.4.5. PXR C63396T

In der Kontrollgruppe fanden sich unter 362 Patienten 81 mit dem Genotyp 63396CC (22%), 178 (49%) mit dem Genotyp 63396CT und 103 (28%) mit dem Genotyp 63396TT. In der Studiengruppe wurden von 131 Patienten 18 mit dem Genotyp 63396CC (14%) gefunden, 62 (47%) mit 63396CT und 51 (39%) mit 63396TT. Es ergab sich sowohl in der univariaten als auch in der multivariaten Analyse ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Studiengruppe ( $p=0,03$ ). Die Odds Ratio betrug in der multivariaten Analyse 1,6 (95%-Konfidenzintervall 1,04-2,5). In der Studiengruppe fand sich 63396C>T also 1,6fach häufiger als in der Kontrollgruppe.

#### 3.3.4.6. PXR A7635G

Es wurde in der univariaten Analyse kein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich PXR A7635G zwischen Kontroll- und Studiengruppe gefunden ( $p=0,2$ ).

Tabelle 3.3 zeigt für die einzelnen Variablen die p-Werte aus der univariaten Analyse und – soweit berechnet – aus der multivariaten Analyse die p-Werte und die Odds Ratios.

Tabelle 3.3: Ergebnisse der univariaten und multivariaten Analyse

Variable	p (univariate Analyse)	p (multivariate Analyse)	Odds Ratio (95%-Konfidenzintervall)
ethnische Herkunft	0,002*	0,001*	0,4 (0,2-0,7)
Geschlecht	0,04*	0,54	-
Alter	0,12	0,75	-
CYP2B6 G516T	0,03*	0,007*	2,4 (1,3-4,6)
CYP2B6 T983C	0,14	0,48	-
CAR C540T	0,17	0,005*	0,5 (0,3-0,8)
PXR T44477C	0,32	-	-
PXR C63396T	0,03*	0,03*	1,6 (1,04-2,5)
PXR A7635G	0,2	-	-

\* statistisch signifikant zum Signifikanzniveau  $p=0,05$

## 4 Diskussion

Während in der vorausgehenden Pharmacogenetics-Studie von Wyen der Einfluss verschiedener Faktoren auf den Plasmaspiegel von EFV und NVP analysiert wurde (Wyen 2008), geht die vorliegende Arbeit, die Teil der GenTox-Studie ist, einen Schritt weiter.

Wir postulierten, dass erhöhte EFV-Plasmaspiegel zu vermehrten Nebenwirkungen führen, und dass vermehrte Nebenwirkungen einen frühzeitigen Therapieabbruch herbeiführen können. Daher untersuchten wir retrospektiv die Ausprägung von Faktoren, von denen ein Einfluss auf den EFV-Plasmaspiegel bekannt ist. Unsere Annahme war es, dass sich die Häufigkeit von Faktoren, die den EFV-Plasmaspiegel erhöhen, zwischen Patienten, die eine Therapie mit EFV frühzeitig abgebrochen haben, und solchen unter dauerhafter EFV-Therapie unterscheidet.

Wäre dies der Fall, so könnte man davon ausgehen, dass die Ausprägung von Faktoren, die den EFV-Plasmaspiegel erhöhen und zu vermehrten Nebenwirkungen führen, die Verträglichkeit der Therapie vorhersagen kann. Bei Vorliegen ungünstiger Faktoren könnte man daraufhin prospektiv auf ein erhöhtes Risiko von Nebenwirkungen und einem Therapieabbruch schließen und eine Therapie mit EFV erst gar nicht beginnen.

Nachfolgend soll der in der vorliegenden Arbeit ermittelte Einfluss dieser Variablen auf einen vorzeitigen EFV-Therapieabbruch diskutiert und mit den Ergebnissen anderer Arbeiten verglichen werden. Dabei sei angemerkt, dass die meisten Arbeiten den Einfluss der Variablen auf den EFV-Plasmaspiegel, nicht aber auf die Häufigkeit von Nebenwirkungen oder Therapieabbruch untersucht haben.

### **4.1 Demographische Faktoren**

#### **4.1.1 Ethnische Zugehörigkeit**

Verschiedene Autoren kommen bezüglich unterschiedlich hoher EFV-Plasmaspiegel zwischen Kaukasiern und Afrikanern zu ähnlichen Ergebnissen.

Pfister fand in der Adult AIDS Clinical Trials Group 398 (AACTG 398)-Studie eine um 28% niedrigere EFV-Clearance bei Afrikanern und Hispaniern im Vergleich zu Kaukasiern ( $p=0,03$ ). Als Ursachen diskutierte er unterschiedliche Genotypen des multidrug resistance transporter type 1 (MDR-1) und verschiedene Aktivitäten von CYP450-Isoenzymen (Pfister 2003). Csajka wies ebenfalls eine um 20% erniedrigte EFV-Clearance bei Afrikanern gegenüber Kaukasiern nach (Csajka 2003).



Burger fand in einer Untersuchung an insgesamt 255 Patienten in der univariaten Analyse einen signifikant höheren mittleren EFV-Plasmaspiegel bei Afrikanern gegenüber Kaukasiern. Während dieser bei Kaukasiern im Mittel bei 2,8 µg/ml lag, war er bei Afrikanern median 1 µg/ml höher ( $p=0,003$ ). In der multivariaten Analyse bestätigte sich dieser Befund ( $p<0,001$ ) (Burger 2006).

Ein multivariates Modell, das Stöhr anhand der Daten von 339 Patienten entwickelte, sagte für Afrikaner einen 59% höheren EFV-Plasmaspiegel als für Kaukasier vorher ( $p<0,001$ ) (Stöhr 2008).

Gupta postulierte, dass die bei Afrikanern höheren EFV-Plasmaspiegel auf die erhöhte Frequenz von G516T gegenüber Kaukasiern zurückzuführen sein könnte (Gupta 2008), ein Befund, den auch Haas beschreibt (Haas 2004).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind mit den oben beschriebenen Befunden anderer Autoren nicht in Einklang zu bringen. Patienten afrikanischer Herkunft brachen signifikant seltener eine EFV-Therapie innerhalb von drei Monaten ab als Kaukasier (univariater  $p$ -Wert 0,002; multivariater  $p$ -Wert 0,001). Die multivariate Odds Ratio betrug 0,4 (95%-Konfidenzintervall 0,2-0,7). Zu unserer Hypothese, dass höhere EFV-Plasmaspiegel zu vermehrten Nebenwirkungen und somit häufiger zu einem Therapieabbruch innerhalb von drei Monaten führen, passt dieser Befund nicht. Denn geht man davon aus, dass Afrikaner tendenziell höhere EFV-Plasmaspiegel haben als Kaukasier, müssten sie unserer Hypothese zufolge eher die Therapie vorzeitig abbrechen als Kaukasier. Allerdings setzt dies voraus, dass eine Korrelation zwischen dem EFV-Plasmaspiegel und Nebenwirkungen besteht. Unsere klinische Erfahrung zeigt, dass Patienten afrikanischen Ursprungs Nebenwirkungen eher zu tolerieren bereit sind als solche kaukasischer Herkunft. Vielleicht vermag diese Beobachtung den vorliegenden Befund zu erklären. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um das vorliegende Ergebnis zu replizieren.

#### **4.1.2 Geschlecht**

Einige Studien ergaben, dass Frauen im Mittel einen höheren EFV-Plasmaspiegel haben als Männer (Burger 2006; Nyakutira 2008), andere fanden keine Assoziation zwischen Geschlecht und Höhe des EFV-Plasmaspiegels (Marzolini 2001; Csajka 2003; Pfister 2003; Cabrera 2009). Meibohm diskutiert als physiologische Ursachen unterschiedlicher Medikamenten-Plasmaspiegel zwischen den Geschlechtern eine

geringere Körpergröße und Lebergröße, einen höheren prozentualen Körperfettanteil und ein geringeres Blutvolumen bei Frauen (Meibohm 2002).

Zum Einfluss des Geschlechts auf die Wahrscheinlichkeit eines Abbruchs der Therapie mit EFV gibt es nur wenige Studien (Spire 2004; Smith 2007).

Smith konnte in einer prospektiven Kohortenstudie an 96 Frauen und 337 Männern, die eine EFV-Therapie begannen, nachweisen, dass mit 56,3% gegenüber 41,8% signifikant mehr Frauen nach 96 Wochen die Therapie abgebrochen hatten ( $p=0,005$ ).

Allerdings ist die Aussagekraft eingeschränkt, da Frauen signifikant häufiger afrikanischer Herkunft waren als Männer ( $p=0,02$ ). Es könnten also wie unter 4.1.1 beschrieben genetische Unterschiede eine Rolle gespielt haben; beispielsweise findet sich der SNP CYP2B6 G516T häufiger unter Afrikanern (Haas 2004; Haas 2005; Gupta 2008), was zu höheren EFV-Plasmaspiegeln führen kann. Frauen hatten vor Therapiebeginn mit median 126/ $\mu\text{l}$  signifikant geringere CD4-Zellzahlen als Männer mit 190/ $\mu\text{l}$  ( $p=0,0003$ ); sie könnten also kränker gewesen sein und mehr Begleitmedikamente eingenommen haben als die Männer, was zu mehr Toxizität geführt haben könnte. Weiterhin könnten Frauen wegen Schwangerschaft die Therapie mit EFV abgebrochen haben, da EFV teratogen ist.

Es fällt zudem auf, dass Frauen in dieser Studie unterrepräsentiert waren. Da der Unterschied zwischen Männer und Frauen bezüglich des Therapieabbruchs erst nach 96 Wochen zutage trat, ist die Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zusätzlich eingeschränkt (Smith 2007).

In einer Querschnittsstudie sammelte Spire mittels eines Fragebogens Daten von 327 mit EFV behandelten HIV-Patienten unter anderem zu Depressionen, Suchtverhalten, ART-Regimen und soziodemographischen Faktoren. 175 Patienten hatten EFV mindestens sechs Monate lang eingenommen, 152 hatten die Therapie nach median vier Monaten (Interquartil-Abstand 2-10 Monate) abgebrochen. 23% waren Frauen, 77% Männer. In der logistischen Regression war unter anderem das Geschlecht unabhängig von anderen Faktoren assoziiert mit dem Abbruch der EFV-Therapie. Weibliches Geschlecht erhöhte das Risiko eines Therapieabbruchs um den Faktor 2,2 (95%-Konfidenzintervall 1,2-3,8). Auch hier hätte möglicherweise ein

höherer Frauenanteil unter den Befragten die Aussagekraft in diesem Punkt erhöht (Spire 2004).

In der vorliegenden Arbeit ergab sich in der univariaten Analyse ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Männern und Frauen bezüglich des Therapieabbruchs innerhalb von drei Monaten ( $p=0,04$ ), der aber in der multivariaten Analyse nicht erhalten blieb ( $p=0,54$ ). Auch in der vorliegenden Arbeit war der Frauenanteil an der Gesamtpopulation mit 28% sehr niedrig. Um den Einfluss des Geschlechts auf Nebenwirkungen und Abbruch der EFV-Therapie zu klären, wären große prospektive Kohortenstudien mit einem ausgeglichenen Geschlechterverhältnis sowie mit Ausschluss konfundierender Variablen wie ethnische Herkunft vonnöten.

#### **4.1.3 Alter**

Ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Lebensalter und der Pharmakokinetik von EFV ist in den vorliegenden Studien nicht zu erkennen (Marzolini 2001; Csajka 2003; Pfister 2003; Burger 2006).

Auch in der vorliegenden Arbeit zeigte sich kein signifikanter Einfluss des Lebensalters auf die Wahrscheinlichkeit eines EFV-Therapieabbruchs innerhalb von drei Monaten. Die univariate Analyse lieferte einen p-Wert von 0,12.

## **4.2 CYP2B6**

EFV wird zu 92% durch CYP2B6 zu 8-Hydroxy-EFV und 8,14-Dihydroxy-EFV metabolisiert (Ward 2003); ein alternativer Abbauweg ist die Verstoffwechslung zu 7-Hydroxy-EFV durch CYP2A6 (Desta 2007) und in geringem Ausmaß die Bildung von N-Glucuronid-EFV (Mutlib 1999). Die Konzentration von EFV im Plasma unterliegt einer hohen interindividuellen und geringen intraindividuellen Variabilität (Csajka 2003). Als anzustrebender therapeutischer Bereich wird eine Konzentration von 1 – 4 mg/l im Blut angesehen (Marzolini 2001; Csajka 2003). Oberhalb dieses Bereichs sind verstärkt Nebenwirkungen zu befürchten (Marzolini 2001; Nunez 2001; Gallego 2004; Gutierrez 2005), wobei andere Autoren diesen Zusammenhang nicht feststellen konnten (Clifford 2005; van Luin 2009). In einer groß angelegten Studie von van Luin an 843 Personen wurden Patienten, die eine Therapie mit EFV wegen

Nebenwirkungen oder auf eigenen Wunsch hin innerhalb von zwei Jahren abgebrochen hatten, mit Patienten unter fortdauernder EFV-Therapie verglichen. Es ergab sich bezüglich der EFV-Plasmaspiegel kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (van Luin 2009). Unterhalb 1 mg/l wird eine vermehrte Resistenzentwicklung beobachtet.

Eine verringerte Aktivität oder Menge von CYP2B6 ist mit erhöhten EFV-Konzentrationen im Plasma assoziiert. Man unterscheidet schnelle, intermediäre und langsame Metabolisierer, die jeweils mit entsprechenden genetischen Variationen von CYP2B6 verknüpft sind.

Laut Rotger erklären SNPs von CYP2B6, die zu einer verlangsamten Metabolisierung von EFV führen, zu einem großen Teil ungewöhnlich hohe EFV-Plasmaspiegel. Daher kann das Risiko eines extrem hohen EFV-Plasmaspiegels in Individuen, die einen der verantwortlichen SNPs tragen, als erhöht angesehen werden (Rotger 2007).

Nach di Iulio beeinflussen SNPs von CYP2A6 bei den so genannten langsamen Metabolisierern, deren CYP2B6 eine verminderte Funktion aufweist, bedeutend die Metabolisierungsrate von EFV, jedoch nicht, wenn CYP2B6 voll funktionsfähig ist. Di Iulio postulierte extrem hohe EFV-Plasmaspiegel, wenn sowohl CYP2B6 als auch CYP2A6 auf Grund von SNPs vermindert funktionsfähig sind (di Iulio 2009).

Arab-Alameddine erstellte basierend auf den Daten von di Iulio ein pharmakokinetisches Modell zur Erklärung der Varianz der ermittelten pharmakokinetischen Daten mittels genetischer und demographischer Variablen. In dieser Studie konnte bestätigt werden, dass die EFV-Clearance hauptsächlich durch CYP2B6 beeinflusst wird, aber auch durch CYP2A6 & CYP3A4, vor allem, wenn CYP2B6 eine verminderte Funktion oder Menge aufweist. CYP2B6 erklärte 31% der 65%igen interindividuellen Varianz der EFV-Clearance, weitere 7% wurden erklärt durch CYP2A6, CYP3A4 und Körpergewicht. Das Körpergewicht war der einzige signifikante demographische Faktor. Um EFV-Plasmaspiegel innerhalb des therapeutischen Bereiches zu erlangen, ist je nach Kombination der einzelnen Allele von CYP2B6, 2A6 und 3A4 eine Dosisanpassung erforderlich (Arab-Alameddine 2009). Kwara zeigte zudem einen unabhängigen Einfluss von Polymorphismen der UDP-Glucuronosyl-Transferase 2B7 (UGT2B7) auf den EFV-Plasmaspiegel (Kwara 2009).

Im Folgenden soll nur auf die in der vorliegenden Arbeit untersuchten SNPs CYP2B6 G516T und T983C eingegangen werden, da alle anderen bisher entdeckten SNPs von CYP2B6 entweder einen geringen Einfluss auf den Metabolismus von EFV haben oder aber sehr selten vorkommen (Rotger 2007).

#### **4.2.1 CYP2B6 G516T**

Der Polymorphismus G516T des CYP2B6 ist im Zusammenhang mit EFV der am häufigsten untersuchte SNP. G516T führt an Position 172 zum Ersatz von Glutamin durch Histidin, wodurch CYP2B6 vermindert exprimiert wird und das Proteinprodukt eine verringerte Aktivität aufweist (Desta 2007; Hofmann 2008). G516T ist Bestandteil der Allele CYP2B6\*6, \*7 und \*9.

##### **4.2.1.1. Einfluss von CYP2B6 G516T auf den EFV-Plasmaspiegel**

Viele Autoren fanden einen Einfluss des Polymorphismus G516T auf den Plasmaspiegel von EFV (Haas 2004; King 2008; Wyen 2008), wobei besonders hohe Plasmaspiegel bei Vorliegen von 516TT ermittelt wurden (Haas 2004; Tsuchiya 2004; Haas 2005; Rodriguez-Novoa 2005; Rotger 2005; Ribaldo 2006; Kwara 2008). Allerdings hatten nicht alle 516TT-Träger EFV-Plasmaspiegel oberhalb des therapeutischen Bereichs (Haas 2004; Haas 2005; Rodriguez-Novoa 2005; Rotger 2005; Ramachandran 2009).

Tsuchiya zeigte an 35 Patienten, dass die EFV-Plasmakonzentration bei CYP2B6 \*6/\*6 signifikant höher war als bei Heterozygotie für CYP2B6 \*6 bzw. Fehlen von CYP2B6 \*6. Zusätzlich wurden drei Patienten mit extrem hohen EFV-Plasmakonzentrationen sowie sechs mit normalen EFV-Plasmaspiegeln auf CYP2B6-Polymorphismen untersucht. Alle drei Patienten mit den hohen EFV-Plasmaspiegeln waren homozygote Träger von CYP2B6 \*6, während die sechs Patienten mit normalen EFV-Plasmaspiegeln CYP2B6 \*6 nicht aufwiesen. Es waren also unter 44 Personen fünf Träger von CYP2B6\*6/\*6, und nur diese zeigten EFV-Plasmaspiegel oberhalb 20 µM (6 mg/l). Eine größere Patientenzahl wäre wünschenswert gewesen (Tsuchiya 2004).

Auch Rodriguez-Novoa stellte fest, dass G516T einen Einfluss auf den EFV-Plasmaspiegel hat. In einem Kollektiv von 100 Kaukasiern wiesen 52 Patienten 516GG, 43 516GT und 5 516TT auf. Erhöhte EFV-Plasmaspiegel fanden sich bei 40% der Patienten mit 516TT, 19% der Patienten mit 516GT und nur 5% der Patienten mit 516GG. Auf der anderen Seite hatten 19% der Patienten mit 516GG eine subtherapeutische EFV-Plasmakonzentration, was nur bei einer Person (2%) mit G516T der Fall war. Homozygote und heterozygote G516T-Träger hatten im Median einen EFV-Plasmaspiegel von 2,65 mg/l gegenüber 1,71 mg/l bei Trägern des Wildtyp-Allels. Dieser Unterschied erwies sich als signifikant (Rodriguez-Novoa 2005).

Haas beschäftigte sich in einer retrospektiven explorativen Analyse von Daten einer prospektiven, randomisierten klinischen Studie, der AIDS Clinical Trials Group Study 384 (ACTG384), mit den Langzeitwirkungen von EFV und Nelfinavir über einen Zeitraum von drei Jahren. Dabei wurden 340 Patienten unter EFV-Therapie untersucht. Die Häufigkeit von G516T war 24,4% bei Kaukasiern, 31,3% bei Afrikanern und 34,9% bei Hispaniern, unterschied sich aber nicht signifikant. Die EFV-Plasmaspiegel waren bei Vorliegen von 516TT zweimal so hoch wie bei 516GG. Haas konnte allerdings nicht nachweisen, dass G516T die Wahrscheinlichkeit einer Resistenzentwicklung gegen EFV und Therapieversagen vorauszusagen in der Lage ist. Er kam zu dem Schluss, dass EFV eine relativ große therapeutische Breite haben müsse, da signifikante Unterschiede der Plasmaspiegel nicht zu Unterschieden bezüglich Resistenzentwicklung bzw. Therapieversagen führten (Haas 2005).

**4.2.1.2. Assoziation von CYP2B6 G516T mit Nebenwirkungen unter EFV**  
EFV kann unter anderem zu zentralnervösen Nebenwirkungen führen; darunter fallen zum Beispiel Schlafstörungen, Störungen der Gemütslage und Müdigkeit. Diese Nebenwirkungen sind möglicherweise mit erhöhten EFV-Plasmaspiegeln assoziiert (Marzolini 2001; Nunez 2001; Csajka 2003; Gallego 2004; Gutierrez 2005; Cohen 2009), wobei diese Beziehung nicht in allen Publikationen bestätigt werden konnte (Stahle 2004; Fumaz 2005; Kappelhoff 2005; Rotger 2005; Takahashi 2007; Ramachandran 2009; Read 2009; To 2009; van Luin 2009).

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist im engeren Sinne die Frage, ob zum Therapieabbruch führende Nebenwirkungen unter EFV-Therapie zum Teil auf SNPs,

die die Funktion von CYP2B6 beeinflussen, zurückführbar sind, vermittelt über erhöhte EFV-Plasmaspiegel. Mehrere Autoren beschreiben diesen Zusammenhang (Haas 2004; Tsuchiya 2004; Hasse 2005; Rodriguez-Novoa 2005; Rotger 2005; Mathiesen 2006; Gatanaga 2007; Gatanaga 2009; Puthanakit 2009), andere wiederum fanden diesen Zusammenhang nicht (Saitoh 2007; Ramachandran 2009).

In einer Kohortenstudie über 24 Wochen an 154 Patienten aus der randomisierten Adult AIDS Clinical Trials Group Study A5097 (AACTG 5097) wies Haas nach, dass 516TT verglichen mit 516GT und 516GG zu signifikant höheren EFV-Plasmaspiegeln führte ( $p < 0,0001$ ). G516T war signifikant mit zentralnervösen Symptomen in der ersten Woche nach Beginn der EFV-Einnahme assoziiert ( $p = 0,036$ ), nicht aber nach 24 Wochen ( $p = 0,76$ ). Es kam also trotz persistierend erhöhter EFV-Plasmaspiegel zu einer Rückbildung der Nebenwirkungen. Dies weist auf die Möglichkeit einer Toleranzentwicklung hin. Auch eine Studie von Gutiérrez-Valencia, in der eine schrittweise EFV-Dosiserhöhung von 200 über 400 auf 600 mg verglichen wurde mit der Gabe von 600 mg vom ersten Tag an, zeigte in der ersten Woche nach Therapiebeginn Unterschiede bezüglich zentralnervöser Nebenwirkungen mit einer höheren Frequenz und Intensität in der Gruppe ohne schrittweise Dosiserhöhung, von der zweiten Woche an aber nicht mehr (Gutierrez-Valencia 2009). 47 Patienten brachen in der Studie von Haas die EFV-Therapie vorzeitig ab bzw. hatten hochgradige zentralnervöse Nebenwirkungen; hier gab es keinen signifikanten Zusammenhang mit dem Genotyp (Haas 2004).

Rotger zeigte in einer Untersuchung an 167 HIV-Patienten unter EFV-Therapie, dass 516TT mit signifikant höheren EFV-Konzentrationen im Plasma und in peripheren mononukleären Blutzellen gegenüber 516GG assoziiert war. Die Plasma-AUC war bei 516TT im Median 3fach höher, die intrazelluläre AUC im Median 2,3fach höher. Außerdem war 516TT ein Prädiktor für Schlafstörungen und Müdigkeit ( $p = 0,04$ , Odds Ratio 4,9 [1,1-21] bzw.  $p = 0,03$ , Odds Ratio 5,6 [1,3-25]), nicht aber für Gemütsstörungen ( $p = 0,09$ ). Eine gewisse Schwächung des Effekts ist möglicherweise aufgetreten, weil Patienten, die eine Therapie mit EFV kürzer als einen Monat eingenommen hatten, nicht in der Studie berücksichtigt wurden. Es wäre interessant gewesen, gerade diese Patienten einer Analyse des G516T-Genotyps zu unterziehen. Die mediane Dauer der EFV-Therapie betrug gar 21

Monate. Patienten, die eine Therapie so lange einnehmen, werden vermutlich keine gravierenden Nebenwirkungen haben, da sie die Therapie ansonsten bereits beendet hätten (Rotger 2005).

Hasse berichtete über eine Patientin, die sich unter EFV-Therapie mit psychotischen Symptomen präsentierte. Eine genotypische Untersuchung ergab 516TT, außerdem wurde ein extrem hoher EFV-Plasmaspiegel von 59,4 mg/l gefunden, ein Wert, der fast 15fach höher liegt als die Obergrenze des angestrebten Bereichs von 1 – 4 mg/l. Nach Verringerung der EFV-Dosis auf 200 mg pro Tag verschwanden alle psychotischen Symptome und der EFV-Plasmaspiegel sank langsam in den Normbereich ab. Dieser Fallbericht mag beeindruckend sein, allerdings kann ein einzelner Fallbericht höchstens Anregung zu weiterer Forschung sein und hat im Gegensatz zu großen Studien mit vielen Teilnehmern eine sehr begrenzte Aussagekraft (Hasse, Gunthard et al. 2005).

Einen ähnlichen Bericht gab Lowenhaupt über ein 12jähriges HIV-positives Mädchen, welches unter EFV-Therapie eine Psychose entwickelte. Es wurden ein exzessiv erhöhter EFV-Plasmaspiegel von 19 mg/l und der Genotyp 516GT nachgewiesen. Nach Absetzen von EFV verschwand die Symptomatik (Lowenhaupt 2007).

Gatanaga ermittelte in einer Studie an 456 HIV-Patienten unter Therapie mit 600 mg EFV pro Tag, dass bei 16 Patienten die Genotypen CYP2B6 \*6/\*6 bzw. CYP2B6 \*6/\*26 vorlagen; sowohl CYP2B6\*6 als auch \*26 gehen mit G516T einher. Bei 111 Patienten wurde zusätzlich der EFV-Plasmaspiegel bestimmt. Alle 16 Patienten mit den oben genannten Genotypen hatten signifikant erhöhte EFV-Plasmaspiegel oberhalb von 6 mg/l. Bei 12 Patienten mit erhöhten EFV-Plasmaspiegeln unter 600 mg EFV pro Tag wurde die tägliche Dosis von EFV erfolgreich gesenkt; die Enddosis war bei fünf Patienten 400 mg und bei sieben Patienten 200 mg. Fünf EFV-naive Patienten mit den Genotypen CYP2B6\*6/\*6 bzw. \*6/\*26 erhielten von Anfang an eine reduzierte Dosis von 400 mg EFV täglich, bei zweien wurde die Dosis wegen nach wie vor erhöhter EFV-Plasmaspiegel weiter auf 200 mg gesenkt; zwei Patienten brachen im Folgenden die Therapie mit EFV ab, alle anderen Patienten hatten über sechs Monate lang eine Viruslast unterhalb der Nachweisgrenze. Zehn von 14 dieser Patienten zeigten bei Therapiebeginn zentralnervöse Nebenwirkungen, die sich nach



Dosisreduktion bei allen verbesserten. Allerdings wird eine Verbesserung initial auftretender Nebenwirkungen unter EFV-Therapie generell beschrieben, sodass eine Abhängigkeit von der Dosisreduktion nicht sicher ist. Außerdem könnte ein Placebo-Effekt vorgelegen haben, da den Patienten die erhöhten Plasmaspiegel und die Rückläufigkeit nach Dosisreduktion mitgeteilt wurden.

Die EFV-Plasmaspiegel der 28 516GT-Träger lagen ebenfalls signifikant über denen der 67 516GG-Träger, und niemand aus der Gruppe der 516GG-Träger hatte eine EFV-Konzentration im Plasma oberhalb 6 mg/l (Gatanaga 2007).

In einem Kommentar zu King et al. (King 2008) beschrieb Gatanaga den Fall eines der oben genannten Patienten mit 516TT, der unter 600 mg EFV pro Tag unter Alpträumen litt. Der EFV-Plasmaspiegel war mit 9 – 12 mg/l stark erhöht. Nach Dosisreduktion auf 400 mg EFV pro Tag veränderten sich die Träume hin zu angenehmen Traumgehalten; allerdings blieb der EFV-Plasmaspiegel mit etwa 6 mg/l weiter erhöht. Nach Reduktion der täglichen EFV-Dosis auf 200 mg verschwanden die Träume ganz, und der EFV-Plasmaspiegel sank in den therapeutischen Bereich (Gatanaga 2009).

Diese Befunde sprechen dafür, dass eine genotypische Analyse bei Patienten mit erheblichen zentralnervösen Nebenwirkungen und hohen EFV-Plasmaspiegeln von akademischem Interesse sein kann; eine Reduktion der EFV-Dosis auf 400 oder 200 mg pro Tag unter Kontrolle der Plasmaspiegel könnte zur Abnahme der Nebenwirkungen und so möglicherweise auch zu einer verbesserten Compliance führen.

Diese Behauptung wird unterstützt durch eine Studie van Luins, in der eine Reduktion der EFV-Dosis bei Patienten mit EFV-Plasmaspiegeln oberhalb 4 mg/l tendenziell, wenn auch nicht signifikant, zu einer verminderten Rate an Therapieabbrüchen wegen Toxizität führte (van Luin 2009).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem SNP CYP2B6 G516T und dem Abbruch einer EFV-Therapie innerhalb von drei Monaten gefunden. Der p-Wert der univariaten Analyse war 0,03, die multivariate Analyse ergab  $p=0,007$  und eine Odds Ratio von 2,4 (1,3-4,6). Zwar war bei einem großen Teil der Patienten der Grund des Therapieabbruchs unbekannt (58 Patienten, 44%), weshalb fraglich ist, wie viele der Patienten unter Nebenwirkungen litten; wir postulieren aber, dass ein Therapieabbruch innerhalb von drei Monaten nach Start

hauptsächlich auf Nebenwirkungen zurückzuführen ist. Nimmt man jedoch an, dass ein Teil dieser Patienten wegen Therapieversagen die Therapie abgebrochen hat, würde die Tatsache, dass dennoch ein Effekt zu beobachten war, für die Stärke des Zusammenhangs zwischen Nebenwirkungen und G516T sprechen. Denn 516GG ist häufiger mit einem subtherapeutischen EFV-Plasmaspiegel assoziiert als G516T (Rodriguez-Novoa 2005). Ein subtherapeutischer EFV-Plasmaspiegel birgt möglicherweise aber auch ein größeres Risiko für ein virologisches Therapieversagen. Das bedeutet, dass die Therapieversager in der Studiengruppe tendenziell häufiger 516GG besitzen, was der Assoziation von G516T mit frühzeitigem Therapieabbruch zuwiderläuft.

#### **4.2.2 CYP2B6 T983C**

Der SNP CYP2B6 T983C führt zu einem Austausch von Isoleucin durch Threonin an Position 328. Die katalytische Aktivität ist mit der des Wildtyp-Allels vergleichbar, allerdings ist die Proteinexpression um etwa 30% vermindert. Der Kombination von T983C und A785G wurde die Bezeichnung CYP2B6\*16 zugewiesen, T983C allein nannte man CYP2B6\*18. Einige Autoren fanden einen Zusammenhang zwischen T983C und dem EFV-Plasmaspiegel (Wang 2006; Rotger 2007; Wyen 2008; Haas 2009; Leger 2009). Besonders hohe EFV-Plasmaspiegel wurden gefunden bei einer Kombination von G516T und T983C (Rotger 2007; Haas 2009). Bislang ist T983C nicht bei Personen kaukasischer Abstammung gefunden worden (Klein 2005; Mehlotra 2007; Rotger 2007; Wyen 2008).

Wang war es, der das Allel CYP2B6\*16 identifizierte. Das Proteinprodukt war bei T983C gegenüber dem Wildtyp CYP2B6\*1 auf etwa 30% vermindert, aber nicht weniger funktionsfähig. Wang vermutete, dass die verminderte Proteinmenge auf Instabilität des Proteins zurückzuführen sei, verursacht durch T983C. A785G allein führte zu einem vermehrten Proteinprodukt gegenüber CYP2B6\*1, in Kombination mit T983C war das Proteinprodukt aber ähnlich vermindert wie bei T983C allein. Das CYP2B6\*16-Allel wurde in dieser Studie unter 42 Schweden nicht gefunden, hatte eine Frequenz von 4,1% unter 147 Türken und 6,9% bei 92 Afrikanern. Es war assoziiert mit signifikant höheren EFV-Plasmaspiegeln ( $p < 0,0001$  im Student-T-Test), ebenso wie G516T (CYP2B6\*6 und CYP2B6\*9) mit  $p < 0,05$ . Die Kombination

aus CYP2B6\*6 und CYP2B6\*16 führte zu besonders hohen EFV-Plasmaspiegeln (Wang 2006).

Auch Wyen fand in der bereits unter 1.4 ausführlich beschriebenen Studie einen signifikanten Zusammenhang von T983C und dem EFV-Plasmaspiegel (multivariater p-Wert<0,0001). Zusätzlich brachen zwei afrikanische Patienten, die eine Homozygotie für 983C aufwiesen, die Therapie mit EFV wegen Neurotoxizität innerhalb einer Woche nach Abnahme der Blutprobe ab (Wyen 2008).

Außer der Arbeit von Wyen fanden sich keine Studien, die den Zusammenhang zwischen T983C und Nebenwirkungen der EFV-Therapie beschreiben.

In der vorliegenden Arbeit ergab sich kein signifikanter Unterschied der Häufigkeit von T983C zwischen Studien- und Kontrollgruppe. Die univariate Analyse ergab einen p-Wert von 0,14 und die multivariate Analyse einen p-Wert von 0,48. In der Studiengruppe fand sich nur ein Patient mit 983CT, alle anderen in dieser Gruppe waren homozygot für das Wildtyp-Allel 983CC. Auf Grund der insgesamt geringen Prävalenz von T983C kann die vorliegende Arbeit keine Aussage über den Einfluss von T983C auf Nebenwirkungen unter EFV-Therapie machen. Dazu sind weitere Studien mit höheren Zahlen von Trägern des SNP T983C erforderlich.

Möglicherweise kann die von Wang postulierte verminderte Stabilität von CYP2B6 bei Vorliegen von T983C durch andere noch unbekannte SNPs ausgeglichen werden. Zudem könnten Induktionsprozesse die Instabilität von CYP2B6 durch vermehrte Synthese des Enzyms teilweise kompensieren.

### **4.3 CAR C540T**

Zum Einfluss des SNP CAR C540T auf den Plasmaspiegel von EFV gibt es bislang lediglich eine prospektive Studie von Cortes, zum Zusammenhang mit Nebenwirkungen unter EFV-Therapie noch keine (Cortes 2009).

Cortes untersuchte in einer Studie an 215 HIV-Patienten aus Chile unter EFV-Therapie seit mindestens zwei Wochen neben dem EFV-Plasmaspiegel auch das Vorliegen von CYP2B6 G516T, T983C und CAR C540T. 11 Patienten (5%) hatten einen EFV-Plasmaspiegel <1 mg/l, bei 45 Patienten (21%) lag er oberhalb 4 mg/l. 208 Patienten wurden bezüglich der oben genannten SNPs getestet; 35% der Patienten wiesen CYP2B6 G516T auf, niemand CYP2B6 T983C und 49% CAR

C540T. In der multivariaten Analyse wurde der Zusammenhang von CYP2B6 G516T mit erhöhten EFV-Plasmaspiegeln bestätigt ( $p < 0,0001$ ), außerdem die Tatsache, dass T983C unter Menschen kaukasischer Herkunft nicht vorkommt. Weiterhin fand sich ein Zusammenhang zwischen CAR C540T und dem EFV-Plasmaspiegel. Dieser war bei Vorliegen von 540TT mit 2,53 mg/l sowohl gegenüber 540CC (2,97 mg/l) als auch gegenüber 540CT (3,28 mg/l) signifikant erniedrigt (univariater p-Wert 0,0286 bzw. 0,0031). In der multivariaten Analyse bestätigte sich dieser signifikante Unterschied ( $p = 0,007$ ). Zusätzlich fand sich ein signifikanter Einfluss von Nikotin-Abusus auf den EFV-Plasmaspiegel, der bei Nichtrauchern höher war. Leider befanden sich im Patientenkollektiv nur 13 Frauen (6%) (Cortes 2009).

In der vorliegenden Arbeit ergab sich zwischen Studien- und Kontrollgruppe zwar in der univariaten Analyse kein signifikanter Unterschied bezüglich der Häufigkeit von CAR C540T ( $p = 0,17$ ), die multivariate Analyse zeigte aber mit  $p = 0,005$  einen signifikanten Unterschied. Die Wahrscheinlichkeit, eine Therapie mit EFV innerhalb von drei Monaten abzubrechen, war bei Vorliegen von C540T geringer (Odds Ratio 0,5 [0,3-0,8]). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Studie von Cortes (Cortes 2009). Weitere prospektive Studien sind notwendig, um den Einfluss von C540T auf den EFV-Plasmaspiegel und auf Nebenwirkungen unter EFV-Therapie zu sichern. Weiterhin muss der Mechanismus, über den CAR C540T zu einem niedrigerem EFV-Plasmaspiegel führt, genau beschrieben werden. Da CAR C540T nicht zu einem Aminosäuren-Austausch (Ikeda 2003), aber zu alternativen Splice-Varianten führt, welche allerdings den Promotor von CYP2B6 in nur reduziertem Maße zu aktivieren in der Lage sind (Jinno 2004), sind die Ergebnisse der Studie von Cortes sowie der vorliegenden Arbeit nicht plausibel. Bei einer reduzierten Aktivierung von CYP2B6 durch CAR würde man eher von einer verringerten CYP2B6-Aktivität ausgehen, welche zu einem höheren EFV-Plasmaspiegel und zu vermehrten Nebenwirkungen unter EFV-Therapie führen würde.

#### **4.4 PXR**

Der Einfluss von SNPs in PXR auf den Plasmaspiegel von EFV sowie Nebenwirkungen unter EFV-Therapie ist bislang noch nicht untersucht worden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Korrelation einiger SNPs in PXR mit dem Abbruch einer EFV-Therapie erstmalig ermittelt. Die untersuchten SNPs wurden bei Lambda

ausführlich untersucht und beschrieben (Lamba 2008), daher wird im Folgenden hauptsächlich Bezug auf die Arbeit von Lamba genommen.

Lamba untersuchte an 24 Proben zuvor ermittelte SNPs in PXR auf ihren Einfluss auf die Expression und Aktivität von CYP3A4. Dazu kultivierte er Hepatozyten von 46 kaukasischen Organspendern, von denen 29 männlich und 17 weiblich waren. Die CYP3A4-Aktivität wurde basal sowie nach Induktion durch Rifampicin gemessen. Weiterhin wurde von den oben genannten Organspendern Lebergewebe auf den Gehalt an mRNA von unter anderem PXR und CYP3A4 mittels Real-time-PCR untersucht. Die gesammelten Daten wurden dann bezüglich solcher Unterschiede geprüft, welche mit der Verteilung der jeweiligen SNPs korrelierten.

Als Limitation der Untersuchung nennt Lamba, dass die Aktivität von CYP3A4 sowie die Menge an mRNA auch durch unterschiedliche Bedingungen in der Lebensumwelt der gespendeten Lebern und durch eine damit einhergehende unterschiedliche Menge an Transkriptionsfaktoren zu erklären sein könnte (Lamba 2008).

#### **4.4.1 PXR T44477C**

Lamba konnte zeigen, dass bei Trägern des Wildtyp-Allels 44477T die Menge an CYP3A4-mRNA tendenziell geringer war, wenn gleichzeitig 63396CT vorlag. Zudem zeigte 44477T, ebenfalls nur der Tendenz nach, eine geringere Induzierbarkeit durch Rifampicin. In Frauen, die 44477TT aufwiesen, war die basale CYP3A4-Aktivität signifikant etwa dreifach höher im Vergleich zu Personen beiderlei Geschlechts mit 44477CC ( $p=0,037$ ) (Lamba 2008). Diese Ergebnisse sind am ehesten so zu deuten, dass der SNP T44477C zu einer basal zwar niedrigeren, aber stärker induzierbaren CYP3A4-Aktivität führt. Somit würde man erwarten, dass der EFV-Plasmaspiegel bei Vorliegen von T44477C niedriger ist als beim Wildtyp 44477TT.

In der vorliegenden Arbeit wurde kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen PXR T44477C und dem vorzeitigen Abbruch einer Therapie mit EFV gefunden. Die univariate Analyse ergab einen p-Wert von 0,32.

Um die klinische Relevanz der von Lamba beschriebenen Ergebnisse zu klären, sind weitere klinische Studien erforderlich.

#### 4.4.2 PXR C63396T

Lamba beobachtete, dass der SNP PXR C63396T zu einer tendenziell gesteigerten Expression von PXR-mRNA und zu einer signifikant ( $p=0,006$ ) vermehrten basalen Aktivität von CYP3A4 führt (Lamba 2008). Eine vermehrte Aktivität von CYP3A4 sollte zu einem beschleunigten Abbau von EFV und damit zu einer niedrigeren EFV-Plasmakonzentration führen. Konsistent mit diesen Ergebnissen wies Siccardi an zwei Kohorten mit 47 bzw. 62 Patienten nach, dass PXR 63396TT die Plasmakonzentration von ungeboostertem Atazanavir, welches durch CYP3A4 abgebaut wird, gegenüber 63396CT bzw. 63396CC signifikant senkt (Siccardi 2008). Bei Lamba war die Assoziation zwischen C63396T und der CYP3A4-Aktivität allerdings nicht signifikant, wenn man nur Frauen betrachtete. Lamba führte das darauf zurück, dass in der Studie weniger Frauen 63396CC aufwiesen als Männer. Lamba fand auch heraus, dass bei Vorliegen von 63396C die Induzierbarkeit von CYP3A4 signifikant größer ist als bei 63396TT. So war bei Individuen mit 63396CC eine 16,46fache ( $\pm 3,1$ ) Induktion von CYP3A4 durch Rifampicin zu beobachten, während sie bei 63396TT nur 9,26fach ( $\pm 6,1$ ) war ( $p=0,004$ ) (Lamba 2008). Somit würde man erwarten, dass bei Vorliegen des SNP 63396TT ein höherer EFV-Plasmaspiegel auftritt, da die Induzierbarkeit von CYP3A4 geringer ist, vorausgesetzt, die Induzierbarkeit von CYP3A4 ist relevanter für den Abbau von EFV als das basale Aktivitätsniveau.

In der vorliegenden Arbeit ergab sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen PXR C63396T und dem Abbruch einer EFV-Therapie innerhalb von drei Monaten nach Beginn. Sowohl in der univariaten als auch in der multivariaten Analyse ergab sich ein p-Wert von 0,03. Bei Vorliegen von PXR C63396T war die Wahrscheinlichkeit, zur Studiengruppe zu gehören, 1,6fach erhöht (Odds Ratio 1,6 [1,04-2,5]).

Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist nur dann vereinbar mit der Beobachtung, dass PXR C63396T zu einer tendenziell gesteigerten Expression von PXR-mRNA und zu einer signifikant vermehrten basalen Aktivität von CYP3A4 führt, wenn die Induzierbarkeit von CYP3A4 für den EFV-Metabolismus eine größere Rolle spielt als die basale Aktivität.

Nur dieser Befund könnte erklären, warum der EFV-Plasmaspiegel höher liegt, wenn das entsprechende Individuum C63396T trägt, da dann CYP3A4 weniger stark induziert würde. Eine basal niedrigere CYP3A4-Aktivität bei C63396T könnte also via

Induktion durch EFV mehr als ausgeglichen werden. Weitere Studien sind auch hier erforderlich, um die komplexen Zusammenhänge aufzuklären.

#### **4.4.3 PXR A7635G**

In der vorliegenden Arbeit konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen PXR A7635G und der Zugehörigkeit zur Studien- bzw. Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Die univariate Analyse ergab einen p-Wert von 0,2.

PXR A7635G führt zu einer größeren Induzierbarkeit der intestinalen CYP3A durch Rifampicin (Zhang 2001), scheint aber keinen signifikanten Einfluss auf die Metabolisierung von EFV zu haben. Wie bei den oben beschriebenen SNPs in PXR sind weitere Studien nötig, um die Relevanz von PXR A7635G für den Metabolismus von EFV zu klären.

#### **4.5 Abschließende Betrachtung**

Es mag eine Limitation der vorliegenden Arbeit sein, dass die klinischen Daten der Patienten retrospektiv gesammelt wurden, was dazu führte, dass in 44% der Patienten der Grund für den Abbruch der EFV-Therapie unbekannt war. Nur 52% der Patienten brachen die Therapie wegen dokumentierter Nebenwirkungen ab. Wir postulierten aber, dass ein frühzeitiger Abbruch der EFV-Therapie in der Regel auf Nebenwirkungen zurückzuführen sein dürfte. In vielen Fällen war die Art der Nebenwirkung nicht zu erfahren, so dass auch andere als zentralnervöse Nebenwirkungen wie zum Beispiel Exantheme miterfasst worden sein könnten. Die gefundenen Effekte müssen durch eine prospektive Studie bestätigt werden, in der Patienten, die ein Therapieregime mit EFV beginnen, kontinuierlich begleitet werden und so das Auftreten von Nebenwirkungen präzise erfasst werden kann. Frauen waren mit 28% der Teilnehmer an der Studie unterrepräsentiert, der Anteil in der Studiengruppe war mit 21% sogar noch geringer.

Zuletzt ist zu beachten, dass univariate und multivariate Analysen nur eine Korrelation von Variablen anzeigen können, jedoch keine kausale Beziehung.

Der Zusammenhang zwischen CYP2B6 G516T und Metabolismus sowie Plasmaspiegel von EFV darf als gesichert gelten; widersprüchliche Evidenz gibt es für den Einfluss von T983C. Die Frage ist, wie viel Relevanz diese Erkenntnisse neben dem Wissenszuwachs für die Praxis haben. Dafür ist zunächst entscheidend, wie viel Varianz des EFV-Plasmaspiegels diese SNPs aufzuklären in der Lage sind. Laut Arab-Alameddine klären Polymorphismen von CYP2B6 31% der 65%igen interindividuellen Varianz des EFV-Plasmaspiegels auf (Arab-Alameddine 2009); einen ähnlichen Wert von 36% fand Kwara in der multiplen linearen Regressionsanalyse der Daten von 65 Patienten. Motsinger ermittelte mittels multifactor dimensionality reduction (MDR), dass G516T allein mit 69%iger Genauigkeit den EFV-Plasmaspiegel von Afrikanern vorhersagen konnte, bei Kaukasiern eine Kombination aus G516T und ABCB1 G2677T mit 82%iger Genauigkeit (Motsinger 2006).

Allerdings sind noch eine ganze Reihe weiterer Faktoren bekannt, die Einfluss auf den EFV-Plasmaspiegel nehmen. Dazu zählen Compliance, Interaktion mit anderen Substanzen, Unterschiede in der Absorption und weitere Einflüsse auf die Metabolisierung neben SNPs von CYP2B6 (Rodriguez-Novoa 2005).

Im Allgemeinen werden die meisten Medikamente über unterschiedliche Stoffwechselwege abgebaut; Einflüsse auf diese Mechanismen haben in der Regel mehrere Gene und dabei auch Allel-Kombinationen. Des Weiteren finden sich komplexe Signalwege, die die Transkription von Genen regulieren, wie zum Beispiel die oben beschriebenen nukleären Rezeptoren CAR und PXR, welche wiederum genetische Polymorphismen aufweisen. Dass die Wissenschaft bei der Erforschung dieser komplexen Netzwerke erst am Anfang steht, dürfte nicht zu bezweifeln sein.

Nicht zuletzt muss der Einfluss zusätzlich eingenommener Substanzen berücksichtigt werden, seien es nun verschriebene Medikamente, pflanzliche Substanzen oder Drogen wie zum Beispiel Coffein und Nikotin, die alle einen Einfluss auf die Verstoffwechslung von Substanzen haben können. Insbesondere bei der antiretroviralen Therapie, die in der Regel aus einer Kombination dreier Substanzen besteht, sind solche Einflüsse beinahe notwendigerweise gegeben (Nolan 2006).

Auch die Metabolisierung von EFV wird über mehrere Mechanismen vermittelt und kann so durch viele Faktoren beeinflusst werden. Wenn CYP2B6 eine verminderte Funktion hat, können alternative Stoffwechselwege via CYP2A6 und CYP3A4/5 mehr Bedeutung erlangen (di Iulio 2009; Kwara 2009). Die EFV-Plasmaspiegel zeigen eine



große interindividuelle Variabilität, unabhängig von Genotypen wie G516T. Das zeigt sich zum Beispiel darin, dass es in vielen Untersuchungen Personen gab, die trotz CYP2B6 516TT EFV-Plasmaspiegel innerhalb des therapeutischen Bereichs hatten (Haas 2004; Haas 2005; Rodriguez-Novoa 2005; Rotger 2005; Wang 2006; Rotger 2007; Kwara 2008; Nyakutira 2008; Wyen 2008; Kwara 2009).

Weiterhin ist CYP2B6 induzierbar, zum einen durch exogene Substanzen wie auch EFV selbst, bezeichnet als Autoinduktion, zum anderen durch die oben beschriebenen Transkriptionsfaktoren PXR und CAR; dass auch PXR und CAR genetische Polymorphismen aufweisen, verdeutlicht die Komplexität des Zusammenspiels der vielen Faktoren. Der Einfluss von CYP2B6-Induktoren bzw. -Inhibitoren auf die Metabolisierung der Substrate von CYP2B6 mag begrenzt sein, wenn homozygote CYP2B6-Varianten vorliegen, die auf Grund genetischer Polymorphismen qualitativ und funktionell verändert sind, wie Kwara und Ramachandran am Beispiel von Rifampicin, einem CYP2B6-Induktor, zeigen konnten (Kwara 2008; Ramachandran 2009). Unter diesem Aspekt kommen SNPs in CYP2B6 sicherlich eine bedeutende Rolle zu.

Angesichts dieser vielfältigen Einflüsse auf die Pharmakokinetik von EFV ist es verständlich, dass einzelne SNPs nur einen Teil der Varianz des EFV-Plasmaspiegels aufklären können. Die Frage für die klinische Praxis ist, ob ein Zusammenhang zwischen einzelnen SNPs und Metabolisierung so stark ist, dass er trotz aller weiteren Einflüsse klinisch relevant wird.

Eine grundlegendere Frage ist aber, ob der EFV-Plasmaspiegel überhaupt eine Relevanz hat für das klinische Ergebnis. Dazu existieren widersprüchliche Daten. Marzolini postulierte einen therapeutischen Bereich von 1 – 4 mg/l, oberhalb dessen verstärkte Toxizität und unterhalb dessen vermehrtes virologisches Versagen zu befürchten sei (Marzolini 2001). Einige Autoren bestätigten diesen Zusammenhang (Nunez 2001; Gallego 2004; Gutierrez 2005), viele fanden ihn nicht (Stahle 2004; Clifford 2005; Kappelhoff 2005; Rotger 2007; Takahashi 2007; van Luin 2009).

Es wurden einige Fälle beschrieben, in denen eine EFV-Dosisreduktion bei Patienten mit exzessiv erhöhten EFV-Plasmaspiegeln und Nebenwirkungen zur Verbesserung der Symptome führte (Hasse 2005; Mathiesen 2006; Gatanaga 2007; Gatanaga 2009). Es muss gleichwohl anerkannt werden, dass auch Patienten mit erhöhten EFV-Plasmaspiegeln häufig eine Abnahme der Nebenwirkungen mit der Zeit erleben, sie entwickeln Toleranz (Haas 2004; Gutierrez-Valencia 2009). Zudem fand van Luin

viele Faktoren für den Abbruch der Therapie mit EFV abseits des EFV-Plasmaspiegels: Geschlecht, HBV- und HCV-Koinfektion, ART-Erfahrung, Zahl der ART-Medikamente, Art des NRTI-Backbones und CD4-Zellzahl-Nadir. Er konnte keine signifikant erhöhten EFV-Plasmaspiegel bei Patienten, die eine EFV-Therapie wegen Nebenwirkungen abgebrochen hatten, gegenüber Patienten unter stabiler EFV-Therapie nachweisen (van Luin 2009). Es müssen also Faktoren existieren, die die Auswirkung erhöhter EFV-Plasmaspiegel auf das klinische Befinden modifizieren können. Die Tatsache, dass jedes Individuum anders mit Nebenwirkungen umgeht, ist nicht zuletzt ein solcher Faktor, und das nur in dem Fall, dass überhaupt Nebenwirkungen wahrgenommen werden.

Dennoch ist nicht zu leugnen, dass eine relevante Beziehung zwischen CYP2B6 G516T und dem EFV-Plasmaspiegel besteht, und dass stark erhöhte EFV-Plasmaspiegel zu vermehrten zentralnervösen Nebenwirkungen führen können. Daher sollte man bei Patienten, die unter EFV-Therapie deutliche und dauerhafte psychiatrische Symptome entwickeln, den EFV-Plasmaspiegel bestimmen, und eventuell auch den CYP2B6 G516T-Genotyp (Lowenhaupt 2007). In den Ländern südlich der Sahara, wo der CYP2B6 G516T-Genotyp besonders häufig ist und der NNRTI EFV regelmäßig Bestandteil der Therapieregime ist, muss genau überlegt werden, wie diese Erkenntnisse in die Praxis umgesetzt werden können. Da die Ressourcen in den meisten Ländern südlich der Sahara begrenzt sind, ist eine Genotypisierung aller Patienten vor Therapiestart sicher nicht bezahlbar, ebenso wenig wie die routinemäßige Bestimmung der Medikamenten-Plasmaspiegel (Rotger 2008). Holford schlug mit der sogenannten target concentration intervention (TCI) einen Ansatz vor, der aus patientenspezifischen Parametern wie Kreatinin-Clearance, Alter und Gewicht mittels pharmakokinetischer Modelle den wahrscheinlichen Plasmaspiegel vorhersagt. Dementsprechend könnte man von vornherein eine reduzierte Dosierung von EFV verabreichen, wenn sie nach dem Modell die Zielkonzentration von EFV verspricht. Allerdings bezieht Holford ebenfalls pharmakogenetische Parameter ein, was die Kosten wiederum steigern würde (Holford 1999). Außerdem könnten fehlerhafte Vorhersagen mit unangebrachter Dosisreduktion zu erniedrigten Plasmaspiegeln führen, die möglicherweise Resistenzentwicklung und Therapieversagen nach sich ziehen würden.

Ein anderer Ansatz gerade für die afrikanischen Länder südlich der Sahara wäre, in dem Wissen um die Häufigkeit von G516T, bei Patienten mit starken

Nebenwirkungen im steady state Plasmaspiegel-Bestimmungen durchzuführen und bei entsprechend erhöhten Werten eine Dosisreduktion z.B. von EFV auf 400 mg / Tag bzw. 200 mg / Tag in Betracht zu ziehen. So ließen sich Nebenwirkungen verringern und die Compliance verbessern, und das unter Vermeidung unnötiger, kostspieliger Untersuchungen. Da die Bestimmung von Plasmaspiegeln ebenfalls hohe Kosten verursacht, ist auch dieser Ansatz kritisierbar. Allerdings würden die Zahl der Untersuchungen und damit die Kosten stark begrenzt, indem man sich auf Patienten konzentriert, die tatsächlich unter Nebenwirkungen leiden. Wichtig wäre, herauszufinden, ob subjektiv beschwerdefreie Patienten mit hohen EFV-Plasmaspiegeln langfristig Schäden erleiden. Ist das nicht der Fall, könnte man sich guten Gewissens auf die Untersuchung von Patienten beschränken, die starke Nebenwirkungen erfahren.

Die vorliegende Arbeit bestätigt die Assoziation des SNP G516T mit Nebenwirkungen unter EFV-Therapie. Wegen der geringen Zahl von Patienten mit dem SNP T983C ist eine Aussage über einen G516T analogen Zusammenhang mit Nebenwirkungen unter EFV-Therapie nicht möglich. Weiters konnte unseres Wissens erstmals ein Zusammenhang zwischen dem SNP C63396T und Nebenwirkungen unter Therapie mit EFV gezeigt werden. Für andere Polymorphismen der Kernrezeptoren CAR und PXR gelang dies nicht. Die vorliegende Arbeit möge ein Anreiz für weitere Forschungstätigkeit im jungen Gebiet der Pharmakogenetik sein. Die erhobenen Befunde müssen durch prospektive Studien bestätigt werden.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit, die Teil der GenTox-Studie ist, sollte überprüft werden, ob Nebenwirkungen, die zum Abbruch der Therapie mit Efavirenz führen, mit einer erhöhten Frequenz der SNPs G516T und T983C in CYP2B6 assoziiert sind, welche mit einer signifikanten Erhöhung der Plasmakonzentration von Efavirenz einhergehen. Die GenTox-Studie folgt der Pharmacogenetics-Studie von Wyen, in der unter anderem eine Assoziation erhöhter EFV-Plasmaspiegel mit den SNPs G516T und T983C nachgewiesen werden konnte. Weiterhin sollte in der vorliegenden Arbeit der Einfluss des SNP C540T in CAR und der SNPs T44477C, C63396T und A7635G in PXR auf die Häufigkeit eines EFV-Therapieabbruchs wegen Nebenwirkungen untersucht werden.

Es wurden Patienten aus dem Deutschen Kompetenznetz HIV/AIDS rekrutiert, die mit EFV behandelt worden waren. Dabei wurden Patienten, welche die Therapie mit dieser Substanz innerhalb von drei Monaten abgebrochen hatten, Patienten unter dauerhafter EFV-Therapie gegenübergestellt.

Die vorliegende Arbeit bestätigt die Assoziation des SNP G516T mit Nebenwirkungen unter EFV-Therapie. Wegen der geringen Zahl von Patienten mit dem SNP T983C ist eine Aussage über einen G516T analogen Zusammenhang mit Nebenwirkungen unter EFV-Therapie nicht möglich. Weiters konnte unseres Wissens erstmals ein Zusammenhang zwischen dem SNP C63396T in PXR und Nebenwirkungen unter Therapie mit EFV gezeigt werden. Für die anderen oben genannten Polymorphismen der Kernrezeptoren CAR und PXR gelang dies nicht. Es mag eine Limitation der vorliegenden Arbeit sein, dass die klinischen Daten der Patienten retrospektiv gesammelt wurden, was dazu führte, dass in 44% der Patienten der Grund für den Abbruch der EFV-Therapie unbekannt war. Nur 52% der Patienten brachen die Therapie wegen dokumentierter Nebenwirkungen ab. Wir postulierten aber, dass ein frühzeitiger Abbruch der EFV-Therapie in der Regel auf Nebenwirkungen zurückzuführen sein dürfte.

Die klinische Relevanz der erhobenen Befunde bedarf weiterer Untersuchungen, da viele weitere Einflussfaktoren auf die Verträglichkeit der Therapie mit EFV existieren. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit müssen durch prospektive Studien bestätigt werden.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Anson, B. D., J. G. Weaver, M. J. Ackerman, O. Akinsete, K. Henry, C. T. January and A. D. Badley (2005). "Blockade of HERG channels by HIV protease inhibitors." Lancet **365**(9460): 682-6.
2. Arab-Alameddine, M., J. Di Iulio, T. Buclin, M. Rotger, R. Lubomirov, M. Cavassini, A. Fayet, L. A. Decosterd, C. B. Eap, J. Biollaz, A. Telenti and C. Csajka (2009). "Pharmacogenetics-based population pharmacokinetic analysis of efavirenz in HIV-1-infected individuals." Clin Pharmacol Ther **85**(5): 485-94.
3. Ariyoshi, N., M. Miyazaki, K. Toide, Y. Sawamura and T. Kamataki (2001). "A single nucleotide polymorphism of CYP2b6 found in Japanese enhances catalytic activity by autoactivation." Biochem Biophys Res Commun **281**(5): 1256-60.
4. Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum and L. Montagnier (2004). "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). 1983." Rev Invest Clin **56**(2): 126-9.
5. Boly, L., V. Cafaro and T. Dyner (2006). "Depressive symptoms predict increased incidence of neuropsychiatric side effects in patients treated with efavirenz." J Acquir Immune Defic Syndr **42**(4): 514-5.
6. Brinkman, K., J. A. Smeitink, J. A. Romijn and P. Reiss (1999). "Mitochondrial toxicity induced by nucleoside-analogue reverse-transcriptase inhibitors is a key factor in the pathogenesis of antiretroviral-therapy-related lipodystrophy." Lancet **354**(9184): 1112-5.
7. Burger, D., I. van der Heiden, C. la Porte, M. van der Ende, P. Groeneveld, C. Richter, P. Koopmans, F. Kroon, H. Sprenger, J. Lindemans, P. Schenk and R. van Schaik (2006). "Interpatient variability in the pharmacokinetics of the HIV non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz: the effect of gender, race, and CYP2B6 polymorphism." Br J Clin Pharmacol **61**(2): 148-54.
8. Burke, D. S. (1997). "Recombination in HIV: an important viral evolutionary strategy." Emerg Infect Dis **3**(3): 253-9.
9. Cabrera, S. E., D. Santos, M. P. Valverde, A. Dominguez-Gil, F. Gonzalez, G. Luna and M. J. Garcia (2009). "Population Pharmacokinetics of Efavirenz in

- Hiv Patients: Influence of the Cyp2b6 Genotype." Antimicrob Agents Chemother.
10. Carr, A., K. Samaras, S. Burton, M. Law, J. Freund, D. J. Chisholm and D. A. Cooper (1998). "A syndrome of peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia and insulin resistance in patients receiving HIV protease inhibitors." AIDS **12**(7): F51-8.
  11. Chang, T. K., S. M. Bandiera and J. Chen (2003). "Constitutive androstane receptor and pregnane X receptor gene expression in human liver: interindividual variability and correlation with CYP2B6 mRNA levels." Drug Metab Dispos **31**(1): 7-10.
  12. Clavel, F., M. Guyader, D. Guetard, M. Salle, L. Montagnier and M. Alizon (1986). "Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2." Nature **324**(6098): 691-5.
  13. Clifford, D. B., S. Evans, Y. Yang, E. P. Acosta, K. Goodkin, K. Tashima, D. Simpson, D. Dorfman, H. Ribaud and R. M. Gulick (2005). "Impact of efavirenz on neuropsychological performance and symptoms in HIV-infected individuals." Ann Intern Med **143**(10): 714-21.
  14. Code, E. L., C. L. Crespi, B. W. Penman, F. J. Gonzalez, T. K. Chang and D. J. Waxman (1997). "Human cytochrome P4502B6: interindividual hepatic expression, substrate specificity, and role in procarcinogen activation." Drug Metab Dispos **25**(8): 985-93.
  15. Cohen, K., A. Grant, C. Dandara, H. McIlleron, L. Pemba, K. Fielding, S. Charalombous, G. Churchyard, P. Smith and G. Maartens (2009). "Effect of rifampicin-based antitubercular therapy and the cytochrome P450 2B6 516G>T polymorphism on efavirenz concentrations in adults in South Africa." Antivir Ther **14**(5): 687-95.
  16. Collazos, J. (2007). "Sexual dysfunction in the highly active antiretroviral therapy era." AIDS Rev **9**(4): 237-45.
  17. Concorde (1994). "Concorde: MRC/ANRS randomised double-blind controlled trial of immediate and deferred zidovudine in symptom-free HIV infection. Concorde Coordinating Committee." Lancet **343**(8902): 871-81.
  18. Connor, E. M., R. S. Sperling, R. Gelber, P. Kiselev, G. Scott, M. J. O'Sullivan, R. VanDyke, M. Bey, W. Shearer, R. L. Jacobson and et al. (1994). "Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with

- zidovudine treatment. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group." N Engl J Med **331**(18): 1173-80.
19. Cortes, C., A. Chaikan, A. Owen, G. Zhang and C. la Porte (2009). Correlates of efavirenz exposure in HIV infected patients from Chile reveals novel associations with a polymorphism in the constitutive androstane receptor and smoking. 10th International Workshop on Clinical Pharmacology of HIV therapy. Amsterdam.
  20. Csajka, C., C. Marzolini, K. Fattinger, L. A. Decosterd, J. Fellay, A. Telenti, J. Biollaz and T. Buclin (2003). "Population pharmacokinetics and effects of efavirenz in patients with human immunodeficiency virus infection." Clin Pharmacol Ther **73**(1): 20-30.
  21. cypalleles.ki.se. (2009). Retrieved 27.07.2009, 2009, from [www.cypalleles.ki.se](http://www.cypalleles.ki.se).
  22. de la Garza, C. L., S. Paoletti-Duarte, C. Garcia-Martin and J. R. Gutierrez-Casares (2001). "Efavirenz-induced psychosis." AIDS **15**(14): 1911-2.
  23. Delta (1996). "Delta: a randomised double-blind controlled trial comparing combinations of zidovudine plus didanosine or zalcitabine with zidovudine alone in HIV-infected individuals. Delta Coordinating Committee." Lancet **348**(9023): 283-91.
  24. Desta, Z., T. Saussele, B. Ward, J. Blievernicht, L. Li, K. Klein, D. A. Flockhart and U. M. Zanger (2007). "Impact of CYP2B6 polymorphism on hepatic efavirenz metabolism in vitro." Pharmacogenomics **8**(6): 547-58.
  25. di Iulio, J., A. Fayet, M. Arab-Alameddine, M. Rotger, R. Lubomirov, M. Cavassini, H. Furrer, H. F. Gunthard, S. Colombo, C. Csajka, C. B. Eap, L. A. Decosterd and A. Telenti (2009). "In vivo analysis of efavirenz metabolism in individuals with impaired CYP2A6 function." Pharmacogenet Genomics **19**(4): 300-9.
  26. Ekins, S., M. Vandenbranden, B. J. Ring, J. S. Gillespie, T. J. Yang, H. V. Gelboin and S. A. Wrighton (1998). "Further characterization of the expression in liver and catalytic activity of CYP2B6." J Pharmacol Exp Ther **286**(3): 1253-9.
  27. Fadel, H. and Z. Temesgen (2007). "Maraviroc." Drugs Today (Barc) **43**(11): 749-58.

28. Fumaz, C. R., J. A. Munoz-Moreno, J. Molto, E. Negrodo, M. J. Ferrer, G. Sirera, N. Perez-Alvarez, G. Gomez, D. Burger and B. Clotet (2005). "Long-term neuropsychiatric disorders on efavirenz-based approaches: quality of life, psychologic issues, and adherence." J Acquir Immune Defic Syndr **38**(5): 560-5.
29. Fumaz, C. R., A. Tuldra, M. J. Ferrer, R. Paredes, A. Bonjoch, T. Jou, E. Negrodo, J. Romeu, G. Sirera, C. Tural and B. Clotet (2002). "Quality of life, emotional status, and adherence of HIV-1-infected patients treated with efavirenz versus protease inhibitor-containing regimens." J Acquir Immune Defic Syndr **29**(3): 244-53.
30. Gallego, L., P. Barreiro, R. del Rio, D. Gonzalez de Requena, A. Rodriguez-Albarino, J. Gonzalez-Lahoz and V. Soriano (2004). "Analyzing sleep abnormalities in HIV-infected patients treated with Efavirenz." Clin Infect Dis **38**(3): 430-2.
31. Galli, M., A. L. Ridolfo, F. Adorni, C. Gervasoni, L. Ravasio, L. Corsico, E. Gianelli, M. Piazza, M. Vaccarezza, A. d'Arminio Monforte and M. Moroni (2002). "Body habitus changes and metabolic alterations in protease inhibitor-naive HIV-1-infected patients treated with two nucleoside reverse transcriptase inhibitors." J Acquir Immune Defic Syndr **29**(1): 21-31.
32. Gallo, R. C., P. S. Sarin, E. P. Gelmann, M. Robert-Guroff, E. Richardson, V. S. Kalyanaraman, D. Mann, G. D. Sidhu, R. E. Stahl, S. Zolla-Pazner, J. Leibowitch and M. Popovic (1983). "Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." Science **220**(4599): 865-7.
33. Gatanaga, H., T. Hayashida, K. Tsuchiya, M. Yoshino, T. Kuwahara, H. Tsukada, K. Fujimoto, I. Sato, M. Ueda, M. Horiba, M. Hamaguchi, M. Yamamoto, N. Takata, A. Kimura, T. Koike, F. Gejyo, S. Matsushita, T. Shirasaka, S. Kimura and S. Oka (2007). "Successful efavirenz dose reduction in HIV type 1-infected individuals with cytochrome P450 2B6 \*6 and \*26." Clin Infect Dis **45**(9): 1230-7.
34. Gatanaga, H. and S. Oka (2009). "Successful genotype-tailored treatment with small-dose efavirenz." AIDS **23**(3): 433-4.
35. Gerstoft, J., A. Malchow-Moller, I. Bygbjerg, E. Dickmeiss, C. Enk, P. Halberg, S. Haahr, M. Jacobsen, K. Jensen, J. Mejer, J. O. Nielsen, H. K. Thomsen, J.



- Sondergaard and I. Lorenzen (1982). "Severe acquired immunodeficiency in European homosexual men." Br Med J (Clin Res Ed) **285**(6334): 17-9.
36. Gibson, G. G., A. Phillips, S. Aouabdi, K. Plant and N. Plant (2006). "Transcriptional regulation of the human pregnane-X receptor." Drug Metab Rev **38**(1-2): 31-49.
37. Goodwin, B., L. B. Moore, C. M. Stoltz, D. D. McKee and S. A. Kliewer (2001). "Regulation of the human CYP2B6 gene by the nuclear pregnane X receptor." Mol Pharmacol **60**(3): 427-31.
38. Gottlieb, M. S., R. Schroff, H. M. Schanker, J. D. Weisman, P. T. Fan, R. A. Wolf and A. Saxon (1981). "Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency." N Engl J Med **305**(24): 1425-31.
39. Gray, R. H., M. J. Wawer, R. Brookmeyer, N. K. Sewankambo, D. Serwadda, F. Wabwire-Mangen, T. Lutalo, X. Li, T. vanCott and T. C. Quinn (2001). "Probability of HIV-1 transmission per coital act in monogamous, heterosexual, HIV-1-discordant couples in Rakai, Uganda." Lancet **357**(9263): 1149-53.
40. Gulick, R. M., H. J. Ribaldo, C. M. Shikuma, S. Lustgarten, K. E. Squires, W. A. Meyer, 3rd, E. P. Acosta, B. R. Schackman, C. D. Pilcher, R. L. Murphy, W. E. Maher, M. D. Witt, R. C. Reichman, S. Snyder, K. L. Klingman and D. R. Kuritzkes (2004). "Triple-nucleoside regimens versus efavirenz-containing regimens for the initial treatment of HIV-1 infection." N Engl J Med **350**(18): 1850-61.
41. Gupta, S. K., S. L. Rosenkranz, Y. S. Cramer, S. L. Koletar, L. A. Szczech, V. Amorosa and S. D. Hall (2008). "The pharmacokinetics and pharmacogenomics of efavirenz and lopinavir/ritonavir in HIV-infected persons requiring hemodialysis." AIDS **22**(15): 1919-27.
42. Gutierrez, F., A. Navarro, S. Padilla, R. Anton, M. Masia, J. Borrás and A. Martín-Hidalgo (2005). "Prediction of neuropsychiatric adverse events associated with long-term efavirenz therapy, using plasma drug level monitoring." Clin Infect Dis **41**(11): 1648-53.
43. Gutierrez-Valencia, A., L. F. Lopez-Cortes, P. Viciano, R. Palacios, R. Ruiz-Valderas, F. Lozano, A. Terron and A. Rivero (2009). "Stepped-Dose vs. Full-Dose Efavirenz for HIV Infection and Neuropsychiatric Adverse Events: A Randomized Trial." Ann Intern Med.

44. Haas, D. W., T. Gebretsadik, G. Mayo, U. N. Menon, E. P. Acosta, A. Shintani, M. Floyd, C. M. Stein and G. R. Wilkinson (2009). "Associations between CYP2B6 Polymorphisms and Pharmacokinetics after a Single Dose of Nevirapine or Efavirenz in African Americans." J Infect Dis **199**(6): 872-880.
45. Haas, D. W., H. J. Ribaldo, R. B. Kim, C. Tierney, G. R. Wilkinson, R. M. Gulick, D. B. Clifford, T. Hulgan, C. Marzolini and E. P. Acosta (2004). "Pharmacogenetics of efavirenz and central nervous system side effects: an Adult AIDS Clinical Trials Group study." AIDS **18**(18): 2391-400.
46. Haas, D. W., L. M. Smeaton, R. W. Shafer, G. K. Robbins, G. D. Morse, L. Labbe, G. R. Wilkinson, D. B. Clifford, R. T. D'Aquila, V. De Gruttola, R. B. Pollard, T. C. Merigan, M. S. Hirsch, A. L. George, Jr., J. P. Donahue and R. B. Kim (2005). "Pharmacogenetics of long-term responses to antiretroviral regimens containing Efavirenz and/or Nelfinavir: an Adult Aids Clinical Trials Group Study." J Infect Dis **192**(11): 1931-42.
47. Hammer, S. M., D. A. Katzenstein, M. D. Hughes, H. Gundacker, R. T. Schooley, R. H. Haubrich, W. K. Henry, M. M. Lederman, J. P. Phair, M. Niu, M. S. Hirsch and T. C. Merigan (1996). "A trial comparing nucleoside monotherapy with combination therapy in HIV-infected adults with CD4 cell counts from 200 to 500 per cubic millimeter. AIDS Clinical Trials Group Study 175 Study Team." N Engl J Med **335**(15): 1081-90.
48. Hamouda, O., U. Marcus, L. Voss and C. Kollan (2007). "[Epidemiology of HIV infections in Germany]." Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz **50**(4): 399-411.
49. Hasse, B., H. F. Gunthard, G. Bleiber and M. Krause (2005). "Efavirenz intoxication due to slow hepatic metabolism." Clin Infect Dis **40**(3): e22-3.
50. Hecht, F. M., M. P. Busch, B. Rawal, M. Webb, E. Rosenberg, M. Swanson, M. Chesney, J. Anderson, J. Levy and J. O. Kahn (2002). "Use of laboratory tests and clinical symptoms for identification of primary HIV infection." AIDS **16**(8): 1119-29.
51. Hofmann, M. H., J. K. Bliedernicht, K. Klein, T. Saussele, E. Schaeffeler, M. Schwab and U. M. Zanger (2008). "Aberrant splicing caused by single nucleotide polymorphism c.516G>T [Q172H], a marker of CYP2B6\*6, is responsible for decreased expression and activity of CYP2B6 in liver." J Pharmacol Exp Ther **325**(1): 284-92.

52. Holford, N. H. (1999). "Target concentration intervention: beyond Y2K." Br J Clin Pharmacol **48**(1): 9-13.
53. Hollingsworth, T. D., R. M. Anderson and C. Fraser (2008). "HIV-1 transmission, by stage of infection." J Infect Dis **198**(5): 687-93.
54. Ikeda, S., K. Kurose, H. Jinno, K. Sai, S. Ozawa, R. Hasegawa, K. Komamura, T. Kotake, H. Morishita, S. Kamakura, M. Kitakaze, H. Tomoike, T. Tamura, N. Yamamoto, H. Kunitoh, Y. Yamada, Y. Ohe, Y. Shimada, K. Shirao, K. Kubota, H. Minami, A. Ohtsu, T. Yoshida, N. Saijo, Y. Saito and J. Sawada (2005). "Functional analysis of four naturally occurring variants of human constitutive androstane receptor." Mol Genet Metab **86**(1-2): 314-9.
55. Ikeda, S., K. Kurose, S. Ozawa, K. Sai, R. Hasegawa, K. Komamura, K. Ueno, S. Kamakura, M. Kitakaze, H. Tomoike, T. Nakajima, K. Matsumoto, H. Saito, Y. Goto, H. Kimura, M. Katoh, K. Sugai, N. Minami, K. Shirao, T. Tamura, N. Yamamoto, H. Minami, A. Ohtsu, T. Yoshida, N. Saijo, Y. Saito and J. Sawada (2003). "Twenty-six novel single nucleotide polymorphisms and their frequencies of the NR113 (CAR) gene in a Japanese population." Drug Metab Pharmacokin **18**(6): 413-8.
56. Ji, J., J. J. Chen, V. L. Braciale and M. W. Cloyd (2007). "Apoptosis induced in HIV-1-exposed, resting CD4+ T cells subsequent to signaling through homing receptors is Fas/Fas ligand-mediated." J Leukoc Biol **81**(1): 297-305.
57. Jinno, H., T. Tanaka-Kagawa, N. Hanioka, S. Ishida, M. Saeki, A. Soyama, M. Itoda, T. Nishimura, Y. Saito, S. Ozawa, M. Ando and J. Sawada (2004). "Identification of novel alternative splice variants of human constitutive androstane receptor and characterization of their expression in the liver." Mol Pharmacol **65**(3): 496-502.
58. Kappelhoff, B. S., F. van Leth, P. A. Robinson, T. R. MacGregor, E. Baraldi, F. Montella, D. E. Uip, M. A. Thompson, D. B. Russell, J. M. Lange, J. H. Beijnen and A. D. Huitema (2005). "Are adverse events of nevirapine and efavirenz related to plasma concentrations?" Antivir Ther **10**(4): 489-98.
59. King, J. and J. A. Aberg (2008). "Clinical impact of patient population differences and genomic variation in efavirenz therapy." AIDS **22**(14): 1709-17.
60. Klein, K., T. Lang, T. Saussele, E. Barbosa-Sicard, W. H. Schunck, M. Eichelbaum, M. Schwab and U. M. Zanger (2005). "Genetic variability of CYP2B6 in populations of African and Asian origin: allele frequencies, novel

- functional variants, and possible implications for anti-HIV therapy with efavirenz." Pharmacogenet Genomics **15**(12): 861-73.
61. Kwara, A., M. Lartey, K. W. Sagoe, E. Kenu and M. H. Court (2009). "CYP2B6, CYP2A6 and UGT2B7 genetic polymorphisms are predictors of efavirenz mid-dose concentration in HIV-infected patients." AIDS.
62. Kwara, A., M. Lartey, K. W. Sagoe, N. L. Rzek and M. H. Court (2009). "CYP2B6 (c.516G-->T) and CYP2A6 (\*9B and/or \*17) polymorphisms are independent predictors of efavirenz plasma concentrations in HIV-infected patients." Br J Clin Pharmacol **67**(4): 427-36.
63. Kwara, A., M. Lartey, K. W. Sagoe, F. Xexemeku, E. Kenu, J. Oliver-Commey, V. Boima, A. Sagoe, I. Boamah, D. J. Greenblatt and M. H. Court (2008). "Pharmacokinetics of efavirenz when co-administered with rifampin in TB/HIV co-infected patients: pharmacogenetic effect of CYP2B6 variation." J Clin Pharmacol **48**(9): 1032-40.
64. Lackritz, E. M., G. A. Satten, J. Aberle-Grasse, R. Y. Dodd, V. P. Raimondi, R. S. Janssen, W. F. Lewis, E. P. t. Notari and L. R. Petersen (1995). "Estimated risk of transmission of the human immunodeficiency virus by screened blood in the United States." N Engl J Med **333**(26): 1721-5.
65. Lamba, J., V. Lamba, S. Strom, R. Venkataramanan and E. Schuetz (2008). "Novel single nucleotide polymorphisms in the promoter and intron 1 of human pregnane X receptor/NR112 and their association with CYP3A4 expression." Drug Metab Dispos **36**(1): 169-81.
66. Lang, T., K. Klein, J. Fischer, A. K. Nussler, P. Neuhaus, U. Hofmann, M. Eichelbaum, M. Schwab and U. M. Zanger (2001). "Extensive genetic polymorphism in the human CYP2B6 gene with impact on expression and function in human liver." Pharmacogenetics **11**(5): 399-415.
67. Lataillade, M. and M. J. Kozal (2006). "The hunt for HIV-1 integrase inhibitors." AIDS Patient Care STDS **20**(7): 489-501.
68. Leger, P., R. Dillingham, C. A. Beauharnais, A. D. Kashuba, N. L. Rezk, D. W. Fitzgerald, J. W. Pape and D. W. Haas (2009). "CYP2B6 variants and plasma efavirenz concentrations during antiretroviral therapy in Port-au-Prince, Haiti." J Infect Dis **200**(6): 955-64.

69. Lieberman-Blum, S. S., H. B. Fung and J. C. Bandres (2008). "Maraviroc: a CCR5-receptor antagonist for the treatment of HIV-1 infection." Clin Ther **30**(7): 1228-50.
70. Locht, P., H. Peyriere, A. Lotthe, J. M. Mauboussin, B. Delmas and J. Reynes (2003). "Long-term assessment of neuropsychiatric adverse reactions associated with efavirenz." HIV Med **4**(1): 62-6.
71. Lowenhaupt, E. A., K. Matson, B. Qureishi, A. Saitoh and D. Pugatch (2007). "Psychosis in a 12-year-old HIV-positive girl with an increased serum concentration of efavirenz." Clin Infect Dis **45**(10): e128-30.
72. MacArthur, R. D., R. M. Novak, G. Peng, L. Chen, Y. Xiang, K. H. Hullsiek, M. J. Kozal, M. van den Berg-Wolf, C. Henely, B. Schmetter and M. Dehlinger (2006). "A comparison of three highly active antiretroviral treatment strategies consisting of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, protease inhibitors, or both in the presence of nucleoside reverse transcriptase inhibitors as initial therapy (CPCRA 058 FIRST Study): a long-term randomised trial." Lancet **368**(9553): 2125-35.
73. Mallal, S. A., M. John, C. B. Moore, I. R. James and E. J. McKinnon (2000). "Contribution of nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors to subcutaneous fat wasting in patients with HIV infection." AIDS **14**(10): 1309-16.
74. Marzolini, C., A. Telenti, L. A. Decosterd, G. Greub, J. Biollaz and T. Buclin (2001). "Efavirenz plasma levels can predict treatment failure and central nervous system side effects in HIV-1-infected patients." AIDS **15**(1): 71-5.
75. Masur, H., M. A. Michelis, J. B. Greene, I. Onorato, R. A. Stouwe, R. S. Holzman, G. Wormser, L. Brettman, M. Lange, H. W. Murray and S. Cunningham-Rundles (1981). "An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction." N Engl J Med **305**(24): 1431-8.
76. Mathiesen, S., U. S. Justesen, H. R. Von Luttichau and A. B. Hansen (2006). "Genotyping of CYP2B6 and therapeutic drug monitoring in an HIV-infected patient with high efavirenz plasma concentrations and severe CNS side-effects." Scand J Infect Dis **38**(8): 733-5.

77. Mehlotra, R. K., M. J. Bockarie and P. A. Zimmerman (2007). "CYP2B6 983T>C polymorphism is prevalent in West Africa but absent in Papua New Guinea: implications for HIV/AIDS treatment." Br J Clin Pharmacol **64**(3): 391-5.
78. Meibohm, B., I. Beierle and H. Derendorf (2002). "How important are gender differences in pharmacokinetics?" Clin Pharmacokinet **41**(5): 329-42.
79. Mocroft, A., C. Katlama, A. M. Johnson, C. Pradier, F. Antunes, F. Mulcahy, A. Chiesi, A. N. Phillips, O. Kirk and J. D. Lundgren (2000). "AIDS across Europe, 1994-98: the EuroSIDA study." Lancet **356**(9226): 291-6.
80. Moutsinger, A. A., M. D. Ritchie, R. W. Shafer, G. K. Robbins, G. D. Morse, L. Labbe, G. R. Wilkinson, D. B. Clifford, R. T. D'Aquila, V. A. Johnson, R. B. Pollard, T. C. Merigan, M. S. Hirsch, J. P. Donahue, R. B. Kim and D. W. Haas (2006). "Multilocus genetic interactions and response to efavirenz-containing regimens: an adult AIDS clinical trials group study." Pharmacogenet Genomics **16**(11): 837-45.
81. Mutlib, A. E., H. Chen, G. A. Nemeth, J. A. Markwalder, S. P. Seitz, L. S. Gan and D. D. Christ (1999). "Identification and characterization of efavirenz metabolites by liquid chromatography/mass spectrometry and high field NMR: species differences in the metabolism of efavirenz." Drug Metab Dispos **27**(11): 1319-33.
82. Nolan, D., E. Phillips and S. Mallal (2006). "Efavirenz and CYP2B6 polymorphism: implications for drug toxicity and resistance." Clin Infect Dis **42**(3): 408-10.
83. Nunez, M., D. Gonzalez de Requena, L. Gallego, I. Jimenez-Nacher, J. Gonzalez-Lahoz and V. Soriano (2001). "Higher efavirenz plasma levels correlate with development of insomnia." J Acquir Immune Defic Syndr **28**(4): 399-400.
84. Nyakutira, C., D. Roshammar, E. Chigutsa, P. Chonzi, M. Ashton, C. Nhachi and C. Masimirembwa (2008). "High prevalence of the CYP2B6 516G-->T(\*6) variant and effect on the population pharmacokinetics of efavirenz in HIV/AIDS outpatients in Zimbabwe." Eur J Clin Pharmacol **64**(4): 357-65.
85. Palella, F. J., Jr., K. M. Delaney, A. C. Moorman, M. O. Loveless, J. Fuhrer, G. A. Satten, D. J. Aschman and S. D. Holmberg (1998). "Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators." N Engl J Med **338**(13): 853-60.

86. Parienti, J. J., V. Massari, D. Rey, P. Poubeau and R. Verdon (2007). "Efavirenz to nevirapine switch in HIV-1-infected patients with dyslipidemia: a randomized, controlled study." Clin Infect Dis **45**(2): 263-6.
87. Peeters, M., M. L. Chaix and E. Delaporte (2008). "[Genetic diversity and phylogeographic distribution of SIV: how to understand the origin of HIV]." Med Sci (Paris) **24**(6-7): 621-8.
88. Perez-Molina, J. A. (2002). "Safety and tolerance of efavirenz in different antiretroviral regimens: results from a national multicenter prospective study in 1,033 HIV-infected patients." HIV Clin Trials **3**(4): 279-86.
89. Pfister, M., L. Labbe, S. M. Hammer, J. Mellors, K. K. Bennett, S. Rosenkranz and L. B. Sheiner (2003). "Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of efavirenz, nelfinavir, and indinavir: Adult AIDS Clinical Trial Group Study 398." Antimicrob Agents Chemother **47**(1): 130-7.
90. Puthanakit, T., P. Tanpaiboon, L. Aурpibul, T. R. Cressey and V. Sirisanthana (2009). "Plasma efavirenz concentrations and the association with CYP2B6-516G >T polymorphism in HIV-infected Thai children." Antivir Ther **14**(3): 315-20.
91. Quattrochi, L. C. and P. S. Guzelian (2001). "Cyp3A regulation: from pharmacology to nuclear receptors." Drug Metab Dispos **29**(5): 615-22.
92. Rahim, S., O. Ortiz, M. Maslow and R. Holzman (2004). "A case-control study of gynecomastia in HIV-1-infected patients receiving HAART." AIDS Read **14**(1): 23-4, 29-32, 35-40.
93. Ramachandran, G., A. K. Hemanth Kumar, S. Rajasekaran, P. Kumar, K. Ramesh, S. Anitha, G. Narendran, P. Menon, C. Gomathi and S. Swaminathan (2009). "CYP2B6 G516T polymorphism but not rifampicin co-administration influence steady state pharmacokinetics of efavirenz in HIV-infected patients in south India." Antimicrob Agents Chemother.
94. Ramachandran, G., K. Ramesh, A. K. Hemanth Kumar, I. Jagan, M. Vasantha, C. Padmapriyadarsini, G. Narendran, S. Rajasekaran and S. Swaminathan (2009). "Association of high T allele frequency of CYP2B6 G516T polymorphism among ethnic south Indian HIV-infected patients with elevated plasma efavirenz and nevirapine." J Antimicrob Chemother **63**(4): 841-3.
95. Read, T. R., D. Carey, P. Mallon, A. Mijch, R. Goodall, F. Hudson, H. Wand and S. Emery (2009). "Efavirenz plasma concentrations did not predict cessation

- of therapy due to neuropsychiatric symptoms in a large randomized trial." AIDS.
96. Reynes, J., K. Arasteh, B. Clotet, C. Cohen, D. A. Cooper, J. F. Delfraissy, J. J. Eron, K. Henry, C. Katlama, D. R. Kuritzkes, J. P. Lalezari, J. Lange, A. Lazzarin, J. S. Montaner, M. Nelson, O. H. M, H. J. Stellbrink, B. Trottier, S. L. Walmsley, N. E. Buss, R. Demasi, J. Chung, L. Donatacci, D. Guimaraes, L. Rowell, A. Valentine, M. Wilkinson and M. P. Salgo (2007). "TORO: ninety-six-week virologic and immunologic response and safety evaluation of enfuvirtide with an optimized background of antiretrovirals." AIDS Patient Care STDS **21**(8): 533-43.
  97. Ribaldo, H. J., D. W. Haas, C. Tierney, R. B. Kim, G. R. Wilkinson, R. M. Gulick, D. B. Clifford, C. Marzolini, C. V. Fletcher, K. T. Tashima, D. R. Kuritzkes and E. P. Acosta (2006). "Pharmacogenetics of plasma efavirenz exposure after treatment discontinuation: an Adult AIDS Clinical Trials Group Study." Clin Infect Dis **42**(3): 401-7.
  98. RKI. (2009). "HIV/AIDS in Deutschland – Eckdaten." Retrieved 01.02.2010, 2010, from [http://www.rki.de/clin\\_160/nn\\_195960/DE/Content/InfAZ/H/HIVAIDS/Epidemiologie/Daten\\_und\\_Berichte/EckdatenDeutschland,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/EckdatenDeutschland.pdf](http://www.rki.de/clin_160/nn_195960/DE/Content/InfAZ/H/HIVAIDS/Epidemiologie/Daten_und_Berichte/EckdatenDeutschland,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/EckdatenDeutschland.pdf).
  99. Robbins, G. K., V. De Gruttola, R. W. Shafer, L. M. Smeaton, S. W. Snyder, C. Pettinelli, M. P. Dube, M. A. Fischl, R. B. Pollard, R. Delapenha, L. Gedeon, C. van der Horst, R. L. Murphy, M. I. Becker, R. T. D'Aquila, S. Vella, T. C. Merigan and M. S. Hirsch (2003). "Comparison of sequential three-drug regimens as initial therapy for HIV-1 infection." N Engl J Med **349**(24): 2293-303.
  100. Rodriguez-Novoa, S., P. Barreiro, A. Rendon, I. Jimenez-Nacher, J. Gonzalez-Lahoz and V. Soriano (2005). "Influence of 516G>T polymorphisms at the gene encoding the CYP450-2B6 isoenzyme on efavirenz plasma concentrations in HIV-infected subjects." Clin Infect Dis **40**(9): 1358-61.
  101. Rotger, M., S. Colombo, H. Furrer, G. Bleiber, T. Buclin, B. L. Lee, O. Keiser, J. Biollaz, L. Decosterd and A. Telenti (2005). "Influence of CYP2B6 polymorphism on plasma and intracellular concentrations and toxicity of



- efavirenz and nevirapine in HIV-infected patients." Pharmacogenet Genomics **15**(1): 1-5.
102. Rotger, M., S. Colombo, H. Furrer, L. Decosterd, T. Buclin and A. Telenti (2007). "Does tenofovir influence efavirenz pharmacokinetics?" Antivir Ther **12**(1): 115-8.
103. Rotger, M., H. Tegude, S. Colombo, M. Cavassini, H. Furrer, L. Decosterd, J. Bliedernicht, T. Saussele, H. F. Gunthard, M. Schwab, M. Eichelbaum, A. Telenti and U. M. Zanger (2007). "Predictive value of known and novel alleles of CYP2B6 for efavirenz plasma concentrations in HIV-infected individuals." Clin Pharmacol Ther **81**(4): 557-66.
104. Rotger, M. and A. Telenti (2008). "Optimizing efavirenz treatment: CYP2B6 genotyping or therapeutic drug monitoring?" Eur J Clin Pharmacol **64**(4): 335-6.
105. Sabato, S., S. Wesselingh, A. Fuller, J. Ray and A. Mijch (2002). "Efavirenz-induced catatonia." AIDS **16**(13): 1841-2.
106. Saitoh, A., C. V. Fletcher, R. Brundage, C. Alvero, T. Fenton, K. Hsia and S. A. Spector (2007). "Efavirenz pharmacokinetics in HIV-1-infected children are associated with CYP2B6-G516T polymorphism." J Acquir Immune Defic Syndr **45**(3): 280-5.
107. Schacker, T. W., P. L. Nguyen, G. J. Beilman, S. Wolinsky, M. Larson, C. Reilly and A. T. Haase (2002). "Collagen deposition in HIV-1 infected lymphatic tissues and T cell homeostasis." J Clin Invest **110**(8): 1133-9.
108. Siccardi, M., A. D'Avolio, L. Baietto, S. Gibbons, M. Sciandra, D. Colucci, S. Bonora, S. Khoo, D. J. Back, G. Di Perri and A. Owen (2008). "Association of a single-nucleotide polymorphism in the pregnane X receptor (PXR 63396C-->T) with reduced concentrations of unboosted atazanavir." Clin Infect Dis **47**(9): 1222-5.
109. Siegal, F. P., C. Lopez, G. S. Hammer, A. E. Brown, S. J. Kornfeld, J. Gold, J. Hassett, S. Z. Hirschman, C. Cunningham-Rundles, B. R. Adelsberg and et al. (1981). "Severe acquired immunodeficiency in male homosexuals, manifested by chronic perianal ulcerative herpes simplex lesions." N Engl J Med **305**(24): 1439-44.
110. Siliciano, J. D., J. Kajdas, D. Finzi, T. C. Quinn, K. Chadwick, J. B. Margolick, C. Kovacs, S. J. Gange and R. F. Siliciano (2003). "Long-term follow-up studies

- confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells." Nat Med **9**(6): 727-8.
111. Simonitsch, I., A. Geusau, A. Chott and W. Jurecka (2000). "Cutaneous dendritic cells are main targets in acute HIV-1-infection." Mod Pathol **13**(11): 1232-7.
  112. Smith, C. J., C. A. Sabin, M. S. Youle, F. C. Lampe, S. Bhagani, S. Madge, D. Puradiredja, M. A. Johnson and A. N. Phillips (2007). "Response to efavirenz-containing regimens in previously antiretroviral-naive HIV-positive patients: the role of gender." J Acquir Immune Defic Syndr **46**(1): 62-7.
  113. Spire, B., P. Carrieri, M. A. Garzot, M. L'Henaff and Y. Obadia (2004). "Factors associated with efavirenz discontinuation in a large community-based sample of patients." AIDS Care **16**(5): 558-64.
  114. Squibb, F. B.-M. (2008). "Fachinformation Sustiva."
  115. Stahle, L., L. Moberg, J. O. Svensson and A. Sonnerborg (2004). "Efavirenz plasma concentrations in HIV-infected patients: inter- and intraindividual variability and clinical effects." Ther Drug Monit **26**(3): 267-70.
  116. Stohr, W., D. Back, D. Dunn, C. Sabin, A. Winston, R. Gilson, D. Pillay, T. Hill, J. Ainsworth, A. Pozniak, C. Leen, L. Bansi, M. Fisher, C. Orkin, J. Anderson, M. Johnson, P. Easterbrook, S. Gibbons and S. Khoo (2008). "Factors influencing efavirenz and nevirapine plasma concentration: effect of ethnicity, weight and co-medication." Antivir Ther **13**(5): 675-85.
  117. Takahashi, M., S. Ibe, Y. Kudaka, N. Okumura, A. Hirano, T. Suzuki, N. Mamiya, M. Hamaguchi and T. Kaneda (2007). "No observable correlation between central nervous system side effects and EFV plasma concentrations in Japanese HIV type 1-infected patients treated with EFV containing HAART." AIDS Res Hum Retroviruses **23**(8): 983-7.
  118. To, K. W., S. T. Liu, S. W. Cheung, D. P. Chan, R. C. Chan and S. S. Lee (2009). "Pharmacokinetics of plasma efavirenz and CYP2B6 polymorphism in southern Chinese." Ther Drug Monit **31**(4): 527-30.
  119. Torre, D., R. Tambini and F. Speranza (2001). "Nevirapine or efavirenz combined with two nucleoside reverse transcriptase inhibitors compared to HAART: a meta-analysis of randomized clinical trials." HIV Clin Trials **2**(2): 113-21.

120. Trottier, B., S. Walmsley, J. Reynes, P. Piliero, M. O'Hearn, M. Nelson, J. Montaner, A. Lazzarin, J. Lalezari, C. Katlama, K. Henry, D. Cooper, B. Clotet, K. Arasteh, J. F. Delfraissy, H. J. Stellbrink, J. Lange, D. Kuritzkes, J. J. Eron, Jr., C. Cohen, T. Kinchelov, A. Bertasso, E. Labriola-Tompkins, A. Shikhman, B. Atkins, L. Bourdeau, C. Natale, F. Hughes, J. Chung, D. Guimaraes, C. Drobnes, S. Bader-Weder, R. Demasi, L. Smiley and M. P. Salgo (2005). "Safety of enfuvirtide in combination with an optimized background of antiretrovirals in treatment-experienced HIV-1-infected adults over 48 weeks." J Acquir Immune Defic Syndr **40**(4): 413-21.
121. Tsuchiya, K., H. Gatanaga, N. Tachikawa, K. Teruya, Y. Kikuchi, M. Yoshino, T. Kuwahara, T. Shirasaka, S. Kimura and S. Oka (2004). "Homozygous CYP2B6 \*6 (Q172H and K262R) correlates with high plasma efavirenz concentrations in HIV-1 patients treated with standard efavirenz-containing regimens." Biochem Biophys Res Commun **319**(4): 1322-6.
122. UNAIDS. (2009). "AIDS epidemic update : November 2009." Retrieved 01.02.2010, 2010, from [http://data.unaids.org:80/pub/Report/2009/JC1700\\_Epi\\_Update\\_2009\\_en.pdf](http://data.unaids.org:80/pub/Report/2009/JC1700_Epi_Update_2009_en.pdf).
123. van Leth, F., P. Phanuphak, K. Ruxrungtham, E. Baraldi, S. Miller, B. Gazzard, P. Cahn, U. G. Laloo, I. P. van der Westhuizen, D. R. Malan, M. A. Johnson, B. R. Santos, F. Mulcahy, R. Wood, G. C. Levi, G. Reboledo, K. Squires, I. Cassetti, D. Petit, F. Raffi, C. Katlama, R. L. Murphy, A. Horban, J. P. Dam, E. Hassink, R. van Leeuwen, P. Robinson, F. W. Wit and J. M. Lange (2004). "Comparison of first-line antiretroviral therapy with regimens including nevirapine, efavirenz, or both drugs, plus stavudine and lamivudine: a randomised open-label trial, the 2NN Study." Lancet **363**(9417): 1253-63.
124. van Luin, M., W. P. Bannister, A. Mocroft, P. Reiss, G. Di Perri, G. Peytavin, J. Molto, A. Karlson, A. Castagna, M. Beniowski, J. D. Lundgren and D. M. Burger (2009). "Absence of a relation between efavirenz plasma concentrations and toxicity-driven efavirenz discontinuations in the EuroSIDA study." Antivir Ther **14**(1): 75-83.
125. van Luin, M., L. Gras, C. Richter, M. E. Ende, J. M. Prins, F. D. Wolf, D. M. Burger and F. W. Wit (2009). "Efavirenz Dose Reduction Is Safe in Patients With High Plasma Concentrations and May Prevent Efavirenz Discontinuations." J Acquir Immune Defic Syndr.

126. Wang, J., A. Sonnerborg, A. Rane, F. Josephson, S. Lundgren, L. Stahle and M. Ingelman-Sundberg (2006). "Identification of a novel specific CYP2B6 allele in Africans causing impaired metabolism of the HIV drug efavirenz." Pharmacogenet Genomics **16**(3): 191-8.
127. Ward, B. A., J. C. Gorski, D. R. Jones, S. D. Hall, D. A. Flockhart and Z. Desta (2003). "The cytochrome P450 2B6 (CYP2B6) is the main catalyst of efavirenz primary and secondary metabolism: implication for HIV/AIDS therapy and utility of efavirenz as a substrate marker of CYP2B6 catalytic activity." J Pharmacol Exp Ther **306**(1): 287-300.
128. Ward, D. J. and J. M. Curtin (2006). "Switch from efavirenz to nevirapine associated with resolution of efavirenz-related neuropsychiatric adverse events and improvement in lipid profiles." AIDS Patient Care STDS **20**(8): 542-8.
129. Wawer, M. J., R. H. Gray, N. K. Sewankambo, D. Serwadda, X. Li, O. Laeyendecker, N. Kiwanuka, G. Kigozi, M. Kiddugavu, T. Lutalo, F. Nalugoda, F. Wabwire-Mangen, M. P. Meehan and T. C. Quinn (2005). "Rates of HIV-1 transmission per coital act, by stage of HIV-1 infection, in Rakai, Uganda." J Infect Dis **191**(9): 1403-9.
130. Willson, T. M. and S. A. Kliewer (2002). "PXR, CAR and drug metabolism." Nat Rev Drug Discov **1**(4): 259-66.
131. Wyen, C., H. Hendra, M. Vogel, C. Hoffmann, H. Knechten, N. H. Brockmeyer, J. R. Bogner, J. Rockstroh, S. Esser, H. Jaeger, T. Harrer, S. Mauss, J. van Lunzen, N. Skoetz, A. Jetter, C. Groneuer, G. Fatkenheuer, S. H. Khoo, D. Egan, D. J. Back and A. Owen (2008). "Impact of CYP2B6 983T>C polymorphism on non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor plasma concentrations in HIV-infected patients." J Antimicrob Chemother **61**(4): 914-8.
132. Xie, W., J. L. Barwick, C. M. Simon, A. M. Pierce, S. Safe, B. Blumberg, P. S. Guzelian and R. M. Evans (2000). "Reciprocal activation of xenobiotic response genes by nuclear receptors SXR/PXR and CAR." Genes Dev **14**(23): 3014-23.
133. Zack, J. A., S. J. Arrigo, S. R. Weitsman, A. S. Go, A. Haislip and I. S. Chen (1990). "HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure." Cell **61**(2): 213-22.

134. Zhang, J., P. Kuehl, E. D. Green, J. W. Touchman, P. B. Watkins, A. Daly, S. D. Hall, P. Maurel, M. Relling, C. Brimer, K. Yasuda, S. A. Wrighton, M. Hancock, R. B. Kim, S. Strom, K. Thummel, C. G. Russell, J. R. Hudson, Jr., E. G. Schuetz and M. S. Boguski (2001). "The human pregnane X receptor: genomic structure and identification and functional characterization of natural allelic variants." Pharmacogenetics **11**(7): 555-72.

## 7 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.