

**Mutationsanalyse des HSV-1 DNA-Polymerase-Gens
(U_L30) im Kontext von Polymorphismus und ACV-
Resistenz bei Patienten nach Stammzelltransplantation**

Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Henschel, Annika Maria

2015

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. K. Hamprecht
2. Berichterstatter: Professor Dr. C. Wolz

Abkürzungen:

A	Adenin
aa	Aminosäure
Abb.	Abbildung
Abk.	Abkürzung
ACV	Aciclovir
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
bp	Basenpaar
BVUD	Brivudin
C	Cytosin
CA	Carcinom
CDV	Cidofovir
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CPE	Zytopathischer Effekt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FCV	Famciclovir
G	Guanin
GCV	Ganciclovir
grenzw.	grenzwertig
GvHD	Graft-versus-Host-Disease
HHV	Humane Herpesviren
HSV	Herpes Simplex Virus
LAT	latency-associated transcript
n.b.	nicht bestimmt
nm	Nanometer
n.n.	nicht nachweisbar
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
nt.	Nukleotid
NTP	Nukleosidtriphosphat
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
PCV	Penciclovir

Abkürzungen

PFA	Foscarnet
PRA	Plaquereduktionstest
r	resistent
RNA	Ribonukleinsäure
s	sensitiv
SCT	Stammzelltransplantation
T	Thymin
TK	Thymidinkinase
VACV	Valaciclovir
Z.n.	Zustand nach
Z.v.	Zustand vor
ZNS	Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	7
1.1	Herpesviren	7
	1.1.1 Familie der Herpesviridae	7
	1.1.2 Morphologie der Herpesviren	9
	1.1.3 Lytischer Replikationszyklus	11
	1.1.4 Latenz	12
	1.1.5 HSV Typ 1 Genom	13
1.2	Epidemiologie des HSV Typ 1	15
1.3	Klinik der HSV Typ 1 Infektion	15
	1.3.1 HSV-Infektionen nach Stammzelltransplantation	16
1.4	Diagnose der HSV Typ 1 Infektion	18
1.5	Therapie und Prophylaxe der HSV-Infektion	18
	1.5.1 Entwicklung antiviraler Substanzen	18
	1.5.2 Aciclovir	19
	1.5.3 Valaciclovir	20
	1.5.4 Penciclovir	21
	1.5.5 Famciclovir	21
	1.5.6 Brivudin	22
	1.5.7 Ganciclovir	22
	1.5.8 Foscarnet	23
	1.5.9 Cidofovir	23
1.6	HSV - Infektion und Virostatikaresistenz	24
	1.6.1 U _L 23	26
	1.6.2 U _L 30	26
1.7	Nachweis einer Chemotherapeutika-Resistenz	27
	1.7.1 Phänotypische Tests	27
	1.7.2 Genotypischer Test	28
1.8	Ziel dieser Arbeit	28

2.	Material und Methoden	30
2.1	Gewinnung von HSV-Isolaten	30
2.1.1	HSV-Isolate von Patienten nach SCT	30
2.1.2	Zellkultur	31
2.1.3	Infektion mit HSV-Isolaten	32
2.2	Sequenzierung von U_L30	32
2.2.1	DNA-Isolierung	32
2.2.2	U _L 30 Fragment-PCR	33
2.2.3	Gelelektrophorese	35
2.2.4	Reinigung der PCR-Produkte	36
2.2.5	Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung	37
2.2.6	Sequenzier-PCR	37
2.2.7	DNA-Fällung	37
2.2.8	Sequenzierung	38
2.3	Auswertung der Ergebnisse	39
3.	Ergebnisse	40
3.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	62
4.	Diskussion	64
5.	Zusammenfassung	69
6.	Literatur	71
7.	Anhang	81

1. Einleitung

1.1 Herpesviren

1.1.1 Die Familie der Herpesviridae

Der Name Herpesviren leitet sich von dem griechischen Wort „herpein“ für kriechen ab [111]. Dieser Begriff bezieht sich auf die Art der Ausbreitung des Virus im Körper entlang von Nerven und beschreibt zugleich den durch das Virus ausgelösten Hautausschlag. Herpesviren gehören zu den am weitesten verbreiteten Infektionserregern der Welt. Sie können nicht nur bei allen Ordnungen der Wirbeltiere, sondern auch bei Wirbellosen nachgewiesen werden [21]. Man unterscheidet zurzeit etwa 90 verschiedene Spezies, wobei diese Zahl im Zuge der Einführung neuer Untersuchungstechniken wohl noch ansteigen wird [22]. Der Mensch ist Hauptwirt von acht humanpathogenen Herpesviren, kann jedoch auch von tierpathogenen Stämmen infiziert werden [49]. Zu den humanen Herpesviren gehören das Herpes simplex Virus Typ 1 und 2 (HSV-1 und 2), das Varizella Zoster Virus (VZV), das Epstein-Barr Virus (EBV), das Zytomegalievirus (CMV), das Humane Herpesvirus 6 und 7 (HHV 6 und 7) und das Kaposi-Sarkom assoziierte Humane Herpesvirus 8 (HHV8) [1]. Gemein sind ihnen ein aus DNA bestehendes Genom und eine ähnliche Virionmorphologie. Alle Herpesviren persistieren in einem latenten Stadium im infizierten Organismus und es kann zu Reaktivierungen der Infektionen kommen. Eine weitere gemeinsame Eigenschaft der Herpesviren ist die mit der Replikation einhergehende Zerstörung der Wirtszellen (lytischer Replikationszyklus). Herpesviren besitzen verschiedene biologische Eigenschaften auf Grund derer sie in drei Unterfamilien eingeteilt werden. Zu den Einteilungskriterien gehören das Wirtsspektrum, die Dauer des Replikationszyklus, die Pathogenität und die Mechanismen zur Aufrechterhaltung der Latenz [89].

α -Herpesviren: Sie besitzen ein weites Wirtsspektrum. Aufgrund eines kurzen Replikationszyklus lässt sich bei dieser Untergruppe eine schnelle Vermehrung in der Zellkultur beobachten. Infizierte Wirtszellen werden dabei effizient zerstört. Die Infektion der Zellen wird sichtbar, wenn sie sich abrunden und aus

dem Zellverband lösen. Dieser für Herpesviren charakteristische Effekt wird auch zytopathischer Effekt (CPE) genannt. Im Wirtsorganismus persistieren sie vornehmlich in sensorischen Ganglien. Das HSV Typ 1 und 2 und das VZV gehören in diese Gruppe [89].

β -Herpesviren: Im Vergleich zu den α -Herpesviren ist ihr Wirtsspektrum deutlich eingeschränkt. Sie replizieren sich weniger schnell und vermehren sich daher auch langsamer in Zellkulturen. Bei infizierten Zellen ist eine Zunahme der Zellgröße zu beobachten (Zytomegalie). Primäre Orte der Latenz sind u. a. sekretorische Drüsen, lymphoretikuläre Zellen und die Nieren. Zu dieser Unterfamilie gehören das CMV, sowie das HHV 6 und 7 [89].

γ -Herpesviren: Auch die beiden humanpathogenen Vertreter dieser Unterfamilie, das Epstein-Barr Virus und das Kaposi-Sarkom assoziierte Herpesvirus, zeichnen sich durch ein limitiertes Wirkspektrum aus. Die Replikationsdauer variiert sehr stark und die Viren sind entweder für B- oder T-Lymphozyten spezifisch, können aber auch Epitheloidzellen und Fibroblasten infizieren. Sie etablieren ihre Latenz in lymphatischem Gewebe [89].

In der folgenden Tabelle sind die derzeit bekannten humanen Herpesviren mit ihren assoziierten Krankheitsbildern zusammengestellt. Die Nummerierung erfolgte chronologisch in der Reihenfolge ihrer Entdeckung [89].

Tabelle 1: Die humanpathogenen Herpesviren und assoziierte Krankheitsbilder
Modifiziert nach [26, 70].

Unterfamilie	Humanpathogene Vertreter	Abk.	Krankheitsbilder
α-Herpesviren	Humanes Herpesvirus 1 (Herpes-simplex-Virus Typ 1)	HHV-1 (HSV-1)	Herpes labialis/facialis, Gingivostomatitis, Enzephalitis, Keratitis
	Humanes Herpesvirus 2 (Herpes-simplex-Virus Typ 2)	HHV-2 (HSV-2)	Herpes genitalis, Meningitis, Herpes neonatorum
	Humanes Herpesvirus 3 (Varizella-Zoster-Virus)	HHV-3 (VZV)	Varizellen (Windpocken), Herpes zoster (Gürtelrose), konnatale Infektion, Enzephalitis, Pneumonie
β-Herpesviren	Humanes Herpesvirus 5 (Humanes Zytomegalievirus)	HHV-5 (CMV)	CMV-Mononukleose, konnatale Infektion, Reaktivierung in Laktation, v.a. bei Immunsupprimierten: Myokarditis, Pneumonie, Hepatitis, Enterokolitis, Retinitis, Nephritis, ZNS- Infektionen, Transplantatabstoßung
	Humanes Herpesvirus 6	HHV-6	Exanthema subitum (Dreitagefieber)
	Humanes Herpesvirus 7	HHV-7	nicht gesichert
γ-Herpesviren	Humanes Herpesvirus 4 (Epstein-Barr Virus)	HHV-4 (EBV)	Infektiöse Mononukleose (Pfeiffersches Drüsenfieber), Chronisch aktive EBV-Infektion, Burkitt-Lymphom, Nasopharynxkarzinom
	Humanes Herpesvirus 8 (Kaposi-Sarkom assoziiertes Herpesvirus)	HHV-8	Kaposi-Sarkom, Primäres Effusionslymphom, Multizentrische Castleman- Erkrankung

1.1.2 Morphologie der Herpesviren

Die Zuteilung von Viren zur Familie der Herpesviren erfolgt nach morphologischen Kriterien. Ein typisches Herpesvirus-Partikel (Virion) hat einen Durchmesser von 120 bis 300 nm und setzt sich aus einem Kern (Core), dem Kapsid, dem Tegument und einer Hülle (Envelope) zusammen [89, 112]. Das Virus-Core besteht aus einer fibrillären Proteinmatrix, mit der das DNA-Genom assoziiert ist. Elektronenmikroskopisch kann es einer Spule ähneln, auf der die DNA wie Draht aufgerollt ist [35]. Das Core ist von einer ikosaedrischen (20-

flächigen) Proteinhülle, dem Kapsid umgeben. Beides zusammen nennt man auch Nukleokapsid. Das Kapsid besteht aus einem Hauptkapsidprotein (VP5) und mehreren zusätzlichen Proteinen. Jeweils 6 VP5 bilden ein Kapsomer und 162 Kapsomere bilden das Kapsid [76]. Zwischen dem Kapsid und der Hülle des Virus liegt das Tegument (lat. Tegumentum = Bedeckung). Dieser Begriff wurde 1974 von Roizman und Furlong eingeführt [85]. Es handelt sich dabei um eine unstrukturierte, asymmetrische Proteinmatrix, die bis zu 20 Virusproteine mit regulatorischen Funktionen enthält. Die Schichtdicke des Tegument bedingt u. a. die unterschiedliche Größe der Herpesviren [89]. Die Virushülle besteht aus einer Lipiddoppelschicht, in die bis zu 12 virale Glykoproteine eingelagert sind [44]. Diese Glykoproteine sind u. a. nötig für die Anheftung des Virus an die Wirtszelle, sowie die anschließende Penetration der Zellmembran. Sie tragen somit entscheidend zur Infektiosität des Virus bei [65, 115].

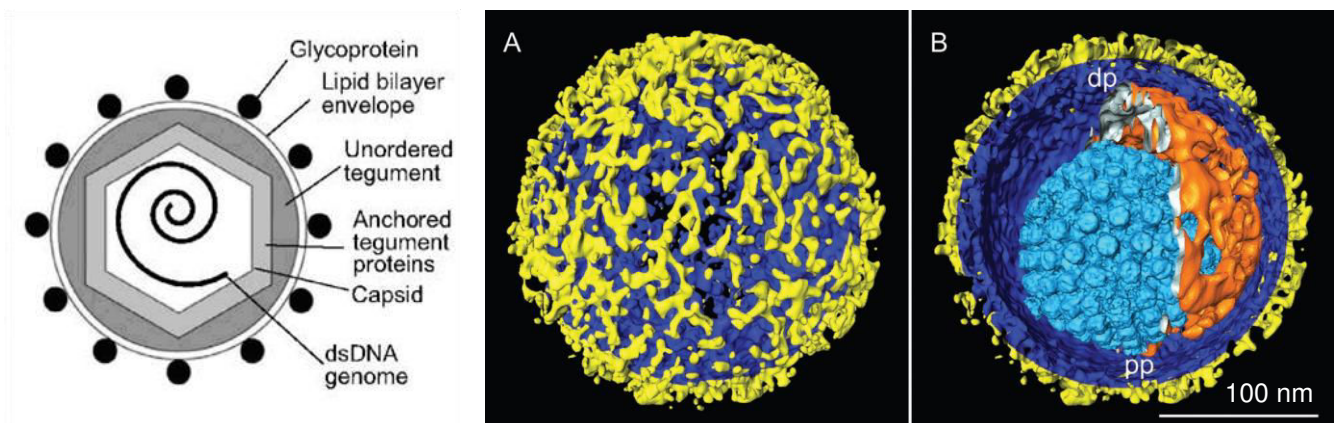


Abb.1 Morphologie der Herpesviren

Das linke Bild zeigt ein HSV Typ 1-Partikel schematisch dargestellt (aus [5]). Auf dem mittleren und rechten Bild sieht man zwei Tomogramme eines schockgefrorenen Herpesvirions, links von außen betrachtet und rechts aufgeschnitten. Die Glykoproteine sind gelb dargestellt, die Hülle dunkelblau, das Tegument orange und das Capsid hellblau (nach [42]).

1.1.3 Lytischer Replikationszyklus

Man kann die Replikation von Viren in vier unterschiedliche Stadien einteilen (siehe auch Abb. 2). Zunächst erfolgt die Anhaftung des Virus an der Wirtszelle, dann die Aufnahme in die Zelle und die Synthese viraler DNA, bis schließlich in einer letzten Phase neue Virionen verpackt und aus der Zelle ausgeschleust werden. Ein kompletter Zyklus dauert etwa 18 bis 20 Stunden. Die Adhäsion des Virus an die Wirtszelle wird von mindestens drei viralen Glykoproteinen (gB, gD, gH) vermittelt, während auf zellulärer Seite membranständige Heparansulfate dazu beitragen [115]. Die Aufnahme des Virus in die Zelle erfolgt durch die Verschmelzung der Virushülle mit der Wirtszellmembran [73]. Dadurch werden das Kapsid und die Tegumentproteine in das Zytosol freigesetzt. Das Kapsid wird entlang von Mikrotubuli zum Zellkern transportiert. Dort bindet es an den Kernporenkomplex, woraufhin die DNA in den Zellkern entlassen wird und dort zirkularisiert [77, 82]. Das Tegumentprotein vhs (virion host shut-off), eine RNase, stoppt die Synthese wirtseigener Proteine und zerstört bereits vorhandene mRNA [96]. Die Unterbrechung des Stoffwechsels der Wirtszelle führt zu ihrer Destruktion. Zusätzlich wird mithilfe eines weiteren Tegumentproteins, dem α -TIF (Trans Inducing Factor oder VP 16) die Transkription viraler Proteine durch die RNA-Polymerase II initiiert. Man kann zwischen drei Arten von viralen Genen unterscheiden, die zeitlich getrennt voneinander exprimiert und synthetisiert werden, den α -, β - und γ - (oder auch Immediate Early [IE]-, Early [E]- und Late [L]-) Genen. Die Regulation der Proteinsynthese erfolgt kaskadenartig, d. h. die Produkte der frühen Gene sind jeweils für die Aktivierung der nachfolgenden Gene nötig. Im Gegenzug stoppen die späten Proteine die Synthese der frühen Proteine [46]. Die Gruppe der α -Gene codiert für fünf hauptsächlich regulatorisch wirkende Proteine, während die Produkte der β -Gene (Thymidinkinase, DNA-Polymerase) v. a. für die Synthese viraler DNA zuständig sind. Glykoproteine und andere Strukturproteine werden von den γ -Genen codiert. Da das DNA-Genom im Zellkern zirkularisiert vorliegt, erfolgt die Replikation im rolling-circle Modus mit Entstehung von DNA-Konkatemeren [37, 63]. Die Konkatemere werden geschnitten und in das Kapsid gepackt [86]. Die momentan favorisierte Theorie

zur Entstehung der Virushülle wurde 1969 von Stackpole entwickelt [100]. Sie beschreibt eine erste Behüllung des Nukleokapsids an der inneren Kernmembran der Wirtszelle, die an der äußeren Kernmembran wieder entfernt wird. Die endgültige Hülle erhält das Virus vermutlich in einem zytoplasmatischen Kompartement, dessen genaue Beschaffenheit und Lokalisation noch unbekannt sind [95].

Abb. 2 Replikationszyklus der Herpesviren, nach [88]

1.1.4 Latenz

Wird ein Organismus erstmalig von Herpes simplex Viren infiziert, kommt es zu einer Virusreplikation an der Eintrittspforte. Anschließend wird das HSV-Virion in Form des Nukleokapsids [66] über intraepitheliale Nervenendigungen in ein Axon aufgenommen und gelangt über retrograden axonalen Transport in das zugehörige sensorische Ganglion (bei HSV-1 das Trigeminalganglion) [66, 87]. Dort kann es weiterhin zur Replikation von Virus-DNA mit einhergehender Zerstörung von Nervenzellen kommen [103]. Die andere Möglichkeit ist die Etablierung einer lebenslangen Latenz, in der sich zwar virale DNA nachweisen

lässt, deren Replikation aber stark unterdrückt wird. Diese Tatsache lässt sich dadurch erklären, dass die mit der Replikation einhergehende Zerstörung der Wirtszellen für die Einrichtung einer latenten Infektion kontraproduktiv wäre [102]. Während des latenten Stadiums kann es zu Reaktivierungen der HSV-Infektion kommen, die mit Krankheitszeichen der Primärinfektion einhergehen können [103]. Das Virus wird in diesem Falle über anterograden axonalen Transport und Freisetzung aus den freien Nervenendungen wieder zurück in das Epithel transportiert [66]. Prädisponierende Faktoren für die Reaktivierung können ein eingeschränkter Immunstatus, UV-Licht, Hormone, physikalische Reize sowie emotionaler und physischer Stress sein [78, 99, 108]. Neben den sensorischen Ganglien können vermutlich auch andere Zellen latent infiziert werden [87]. In einem latent infizierten Neuron liegt die HSV DNA als zirkuläres Episom vor und ist mit Nukleosomen assoziiert [25, 68]. In den meisten Neuronen wird in diesem Stadium nur eine Art von RNA exprimiert, die nicht-kodierende LAT-RNA (latency-associated transcript). Es gibt jedoch einige wenige Neurone (Verhältnis 1:10 in untersuchten Trigeminalganglien), die eine hohe Replikationsrate viraler DNA, sowie virale Proteine aufweisen [33]. Die LAT-RNA überlappt auf dem komplementären DNA-Strang mindestens zwei wichtige α -Gene (codierend für ICP0 und ICP34.5) und ist vermutlich für die effiziente, spontane Reaktivierung aus der Latenz wichtig [79]. Weitere mutmaßliche Eigenschaften der LATs sind die Unterdrückung der Apoptose des Wirtsneurons zur Aufrechterhaltung der Latenz, aber auch die Unterdrückung von Genen des viralen Replikationszyklus [36, 80]. Die genauen molekularen Vorgänge der Etablierung und Aufrechterhaltung der Latenz, sowie der Reaktivierung sind jedoch nach wie vor weitgehend unbekannt [86]. Bislang gibt es keine Möglichkeit das Virus im latenten Stadium zu eradizieren [34].

1.1.5 HSV Typ 1 Genom

Das Genom des HSV Typ 1 liegt, wie das Genom aller Herpesviren, in Form von linearer, doppelsträngiger DNA in den Virionen vor. Die DNA ist 150 Kilobasenpaare lang und hat ein Molekulargewicht von etwa 100×10^6 Dalton [8]. Die Basensequenz enthält 72 Gene und codiert für 70 Proteine [67]. Man

kann sie in eine lange Sequenz (L) mit 126.000 bp und eine kurze Sequenz (S) mit 26.000 bp unterteilen. Beide bestehen jeweils aus einer einmalig vorkommenden Sequenz (U_L und U_S) und aus benachbarten repetitiven Sequenzen. Die repetitiven Sequenzen können wiederum in interne und terminale Wiederholungen (internal und terminal repeats) unterteilt werden [84]. Abb. 3 veranschaulicht den Aufbau des HSV Typ 1 Genoms.

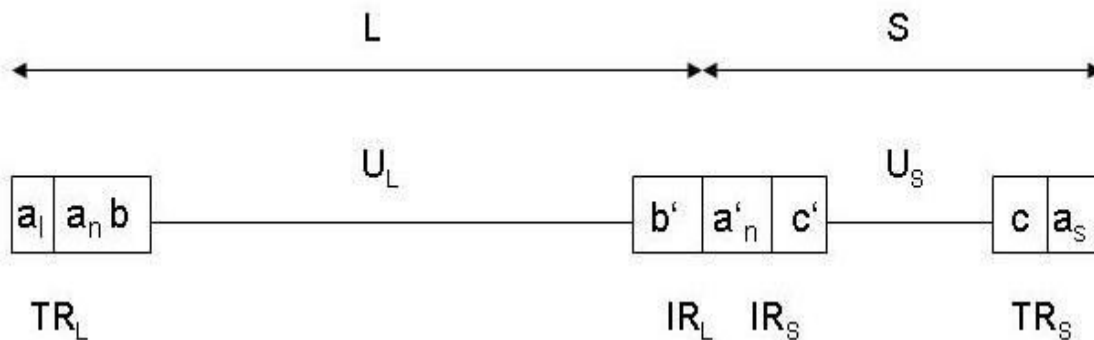


Abb. 3 Das HSV-Genom

Die Pfeile zeigen das lange bzw. das kurze Segment an (L bzw. S). Die Linien kennzeichnen die einmalig vorkommenden langen bzw. kurzen Sequenzen (U_L bzw. U_S). Die Kästchen stehen für die terminalen bzw. internen repeats (TR bzw. IR). a_1 bzw. a_s bezeichnen das terminal repeat des langen bzw. kurzen Segments. a'_n steht für eine variable Anzahl von a-Sequenzen. b steht für die b-Sequenz. b' bezeichnet die invertierte b-Sequenz. c steht für c-Sequenz. c' steht für die invertierte c-Sequenz.

Durch die unterschiedliche Ausrichtung der U_L und U_S -Regionen entstehen 4 Isoformen des HSV Typ 1 Genoms (siehe Abb. 4). Sie kommen zu gleichen Anteilen im Genom vor und unterscheiden sich weder in ihrem Informationsgehalt noch in ihrer Pathogenität [43].

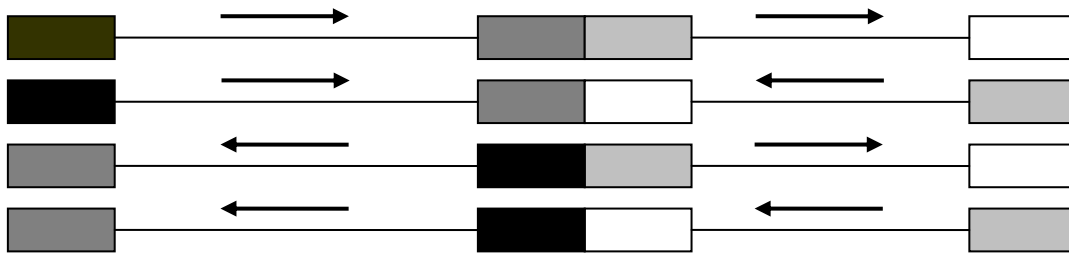


Abb. 4 Die vier Isoformen des HSV-Genoms

Die repetitiven Sequenzen sind als Kästchen und die einmalig vorkommenden Sequenzen als Linien dargestellt. Die Pfeile kennzeichnen die Orientierung der einmaligen Sequenzen zueinander.

1.2 Epidemiologie des HSV Typ 1

Das Herpes simplex Virus Typ 1 ist weltweit verbreitet. Da es eine Latenz im Wirtsorganismus etabliert, die nicht eradizierbar ist, steigt die Durchseuchungsrate mit zunehmendem Alter an. Entscheidend für die Infektionswahrscheinlichkeit sind u.a. der sozioökonomische Status, das Sexualverhalten und die geographische Region. Die Übertragung von HSV Typ 1 erfolgt meist im Kindes- oder Jugendalter durch Schleimhautkontakt [75]. Im Alter von 15 Jahren liegt die Prävalenz bei etwa 40% und steigt auf ein Niveau von 60-90 % bei älteren Erwachsenen [97]. In Deutschland wurde ein Prävalenz von ≥ 88 % bei den über 40-jährigen ermittelt [116]. HSV Typ 1 löst hauptsächlich Erkrankungen im orofazialen Bereich aus.

1.3 Klinik der HSV Typ 1-Infektion

Immunkompetente Personen, die sich primär mit Herpes simplex Typ 1 infizieren, zeigen selten Krankheitszeichen. Symptomatisch Primärinfizierte hingegen entwickeln meist schmerzhafte, vesikuläre Haut- und Schleimhautläsionen im orofazialen Bereich (Gingivostomatitis). Darüber hinaus nimmt die Bedeutung des HSV Typ 1 als Auslöser des primären genitalen Herpes stetig zu [12]. Weitere Symptome sind lokale Lymphknotenschwellungen, Ödeme im pharyngealen Bereich und dadurch

bedingte Schluckstörungen sowie Fieber. In seltenen Fällen treten, auch bei immunkompetenten Personen, Komplikationen wie die Herpesenzephalitis auf, die unbehandelt mit einer Letalität von bis zu 70 % einhergeht. Es ist noch unklar ob es sich dabei um eine Form der Reaktivierung oder um eine Primärinfektion im ZNS handelt [101]. Die Inkubationszeit des Virus beträgt zwischen zwei und zwölf Tagen, die Krankheitsdauer zwischen zwei und drei Wochen und die Ausheilungsdauer der Läsionen etwa acht bis zehn Tage. Im Durchschnitt lässt sich bei allen infizierten Personen das Virus über einen Zeitraum von sieben bis zehn Tagen im Speichel oder im Bläscheninhalt nachweisen. Rezidivierende Herpes simplex Virus-Infektionen sind durch eine schwächer ausgeprägte Form der Primärinfektion gekennzeichnet [111].

1.3.1 HSV-Infektionen nach Stammzelltransplantation

Weltweit werden jährlich mehr als 45.000 Stammzelltransplantationen (STC) durchgeführt (davon sind 30.000 autologe STC und 15.000 allogene STC) [19]. Die ersten Stammzelltransplantationen wurden Ende der 50er Jahre bei zwei Patientinnen mit akuter Leukämie dokumentiert [107]. Die häufigsten Krankheiten, die eine STC erfordern, sind hämatologische Krebserkrankungen, insbesondere Non-Hodgkin Lymphome und akute Leukämien [19]. Die Behandlung der Patienten besteht aus zwei Phasen. Initial wird eine Konditionierungsbehandlung in Form einer Hochdosischemotherapie, oft in Kombination mit einer Bestrahlung, durchgeführt. Das Ziel ist das Sistieren der Krankheit (Remission) bedingt durch die Zerstörung entarteter Zellen, sowie die Unterdrückung des Immunsystems in Hinsicht auf die bevorstehende Transplantation. Im Anschluss an die Konditionierung wird die STC als Konsolidierungsmaßnahme eingeleitet. Die infundierten, gesunden Stammzellen repopulieren das Knochenmark und die Hämatopoese erholt sich innerhalb von zwei bis drei Wochen [15]. Man unterscheidet zwischen eigenen, vor Therapiebeginn aus dem Blut oder Knochenmark gewonnenen Stammzellen (Autologe STC) und fremden Spenderstammzellen (Allogene STC) [15]. Bei der allogenen STC werden Spender mit möglichst identischen HL-Antigenen (Humane Leukozytenantigene) präferiert. HL-Antigene sind

Proteine, die auf allen kernhaltigen Zellen zu finden sind und diese als körpereigen kennzeichnen. Vor allem wenn sie nur ungenügend übereinstimmen, kommt es regelmäßig zu einer gefährlichen immunologischen Reaktion zwischen Transplantat und Empfänger, der sogenannten Graft-versus-Host-Disease (GvHD) [3]. Die neoadjuvante Immunsuppression soll dieses Risiko vermindern. Bei autologen STC fehlt diese Problematik, weswegen sie auch für ältere Patienten geeignet sind [19]. Weniger oft kommt es zu einer Abstoßung des Transplantats, ausgelöst durch den Angriff nichteliminiertes T-Zellen des Empfängers auf die fremden Zellen [10]. Ein gewollter Effekt, der auf HLA-Differenzen beruht, ist der Graft-versus-leukemia-Effekt (GVL). Dabei greifen Spender-T-Zellen die übriggebliebenen, kranken Zellen des Empfängers an und zerstören sie. Krankheitsrückfälle sind daher bei genetisch identischen Transplantaten öfter zu beobachten [48]. Bei knapp 10 % der Stammzelltransplantierten sind Herpes simplex Viren posttransplantär nachweisbar [71]. Prädisponierende Faktoren für Reaktivierungen latenter HSV-Infektionen nach STC sind Hautschädigungen durch die Konditionierungstherapie aber auch durch die ausgeprägte Neutropenie und Immunsuppression [19]. Sie treten vor allem in den ersten zwei bis drei Wochen auf, während Infektionen anderer Genese erst ab einem späteren Zeitpunkt zu beobachten sind. Bis zu 80 % der Stammzelltransplantierten sind asymptomatische Ausscheider des Virus. Zeigen die Patienten klinische Zeichen einer HSV-Infektion, so sind diese oft ausgeprägter als bei Immunkompetenten. Die Läsionen sind tiefer, länger schmerzhaft und heilen langsamer ab [114]. Da das supprimierte Immunsystem nicht in der Lage ist, das Virus schnell zu eliminieren, kann es zu atypischen Manifestationen wie Ösophagitiden, Hepatitiden, retinalen Nekrosen und zu disseminierten HSV-Infektionen kommen [6]. Zusätzlich treten lebensbedrohlichen Erkrankungen wie HSV-Enzephalitiden und HSV-Pneumonien auf [69, 90].

1.4 Diagnose der HSV Typ 1 Infektion

Herpes simplex Virus-Infektionen können sehr variable klinische Manifestationen aufweisen und leicht mit anderen Infektionen, wie z.B. der VZV-Infektion verwechselt werden. HSV-Infektionen lassen sich eindeutig diagnostizieren. Man unterscheidet dabei zwischen direkten (Nachweis des Virus) und indirekten (Serologie) Methoden, wobei die indirekten Methoden (z.B. IgM-Nachweis) nur eine untergeordnete Rolle bei akuten Infektionen einnehmen. Der Stellenwert serologischer HSV-Diagnostik ist auf die Bestimmung des Serostatus beschränkt. Der Goldstandard (außer für die Diagnostik aus Liquor) ist das Anzüchten des Virus in einer geeigneten Zellkultur. Nach ca. 24-48 h bildet sich der für HSV charakteristische zytopathische Effekt (CPE) aus, der mikroskopisch beurteilt werden kann [31]. Noch sensitiver ist der Nachweis von HSV-DNA mithilfe der PCR (Polymerase-Chain-Reaction). Weiterhin gibt es eine Vielzahl indirekter serologischer Untersuchungsmethoden, wie z.B. die Nutzung fluoreszenzmarkierter, monoklonaler Antikörper in Kombination mit Elektronenmikroskopie oder den ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay).

1.5 Therapie und Prophylaxe der HSV-Infektion

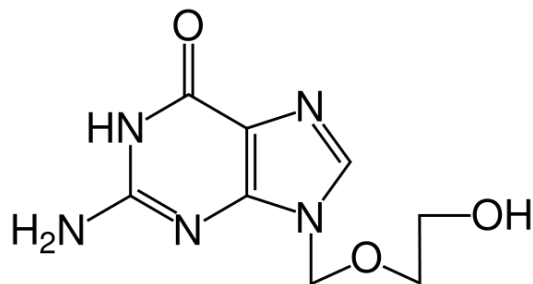
1.5.1 Entwicklung antiviraler Substanzen

Anfang der 60er Jahre wurden mehrere antiviral wirksame Substanzen (Adenosin Arabinoid, Trifluridin und Joddesoxyuridin) evaluiert. Diese erwiesen sich jedoch als zu toxisch und unselektiv. Eine Ausnahme hiervon bildete das Adenosin-Arabinoid, welches jedoch einen sehr eingeschränkten therapeutischen Bereich besitzt. 1974 kam es mit der zufälligen Entdeckung des Guanosinanalogs Aciclovir zum Durchbruch auf dem Gebiet der antiviralen Therapie [29]. ACV wurde 1981 als Mittel der Wahl bei der Behandlung von HSV- und VZV-Infektionen zugelassen. 1988 bekamen seine Entdecker Gertrude B. Elion und George H. Hitchings für diese Leistung den Nobelpreis für Physiologie und Medizin verliehen [30]. Zum jetzigen Zeitpunkt ist es noch nicht möglich gegen HSV zu impfen. Es wird jedoch an möglichen

Impfstoffen auf der Grundlage von inaktivierten Herpes simplex Viren und deren Teilkomponenten (z. B. virale Glykoproteine) oder HSV-DNA geforscht [55].

1.5.2 Aciclovir

2-Amino-6-hydroxy-9-[(2-hydroxyethoxy)methyl]-9H-purin



Aciclovir ist ein Analogon des natürlich vorkommenden Nukleosids Guanosin. Die normalerweise vorhandene (Desoxy-) Pentose ist durch einen azyklischen Rest ersetzt. Es fehlen die C2- und C3-Atome der Pentose. Aciclovir greift in seiner Funktion als Antimetabolit hemmend in die DNA-Synthese ein. Für die Aktivierung zum NTP muss ACV dreimal phosphoryliert werden. Die erste Phosphorylierung am 5' C-Atom kann nur die virale Thymidinkinase durchführen, während die weiteren Phosphorylierungsschritte durch zelluläre Kinasen erfolgen. Dieser Umstand gewährleistet die Selektivität für virusinfizierte Zellen. Das entstandene ACV-Triphosphat kumuliert in den Zellen, da seine Membrangängigkeit durch die dreifache Phosphorylierung aufgehoben wird. Die Selektivität wird durch die etwa 30-fach höhere Affinität von ACV-Triphosphat zur viralen DNA-Polymerase gegenüber der wirtseigenen Polymerase gesteigert. Die DNA-Polymerase wird durch das ACV-Triphosphat kompetitiv gehemmt. Zusätzlich konkurriert das ACV-Triphosphat mit den natürlich vorkommenden Nukleotiden und wird in die DNA eingebaut. Es kommt zum Strangabbruch, da keine 3'-Hydroxylgruppe mehr vorhanden ist, welche die 5'-3'-Strangverlängerung ermöglicht [29].

ACV ist zur Therapie und Prophylaxe von HSV Typ 1 und Typ 2, sowie von VZV Infektionen geeignet [91].

Es ist intravenös, peroral sowie lokal als Creme oder Salbe verabreichbar. Je nach Schwere und Ort der Infektion wird die geeignete Darreichungsform

gewählt. Die Bioverfügbarkeit bei oraler Gabe liegt bei nur 15-30 %. ACV wird zu 70-90 % renal eliminiert, wobei die Halbwertszeit ca. zweieinhalb Stunden beträgt [2].

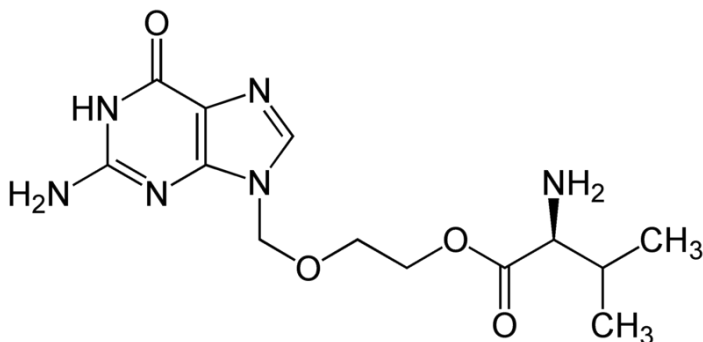
Unerwünschte Nebenwirkungen:

- lokale Venenirritationen, Thrombophlebitiden
- Nephrotoxizität (durch Ausfällung von ACV-Kristallen in den Tubuli)
- Atembeschwerden
- neurologische Störungen (Schwindel, Kopfschmerzen, Halluzinationen, Schläfrigkeit)
- gastroenterologische Störungen (Bauchschmerzen, Durchfall, Übelkeit, Erbrechen)
- Anstieg der Bilirubin-, Leberenzym-, Serumharnstoff- und Kreatinin-Werte
- Absinken hämatologischer Parameter (Anämie, Thrombopenie, Leukopenie, Neutropenie).

Aufgrund des ungeklärten teratogenen Potentials ist ACV während der Schwangerschaft und der Stillzeit, sowie bei Allergie oder Überempfindlichkeit gegen einen der Bestandteile, kontraindiziert [2].

1.5.3 Valaciclovir

(S)-2-[(2-Amino-6-oxo-3,9-dihydropurin-9-yl)-methoxy]ethyl-2-amino-3-methylbutanoat

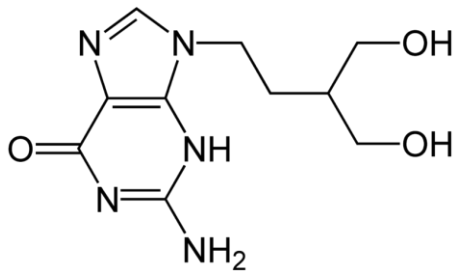


Valaciclovir ist der Valinester des ACV. Nach der Resorption wird es schnell und effektiv zu seinem aktiven Metaboliten ACV umgewandelt. Die orale Bioverfügbarkeit liegt bei etwa 55 %. VACV ist für die orale und lokale Therapie

des Herpes zoster und des primären und rezidivierenden Herpes genitalis zugelassen [53, 98].

1.5.4 Penciclovir

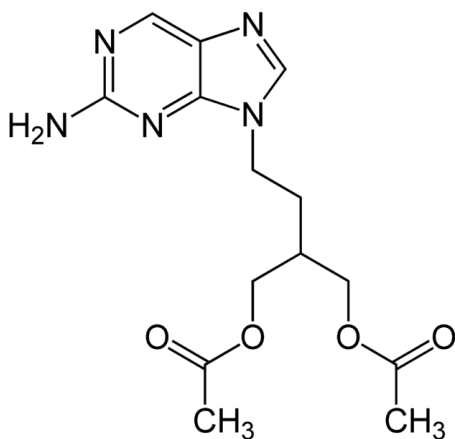
2-Amino-9-[4-hydroxy-3-hydroxymethyl-butyl]- 3,9-dihydropurin-6-on



Penciclovir hat bei peroraler Gabe eine Bioverfügbarkeit von nur 5 % und wird daher nur für die lokale Therapie des primären und rezidivierenden Herpes labialis genutzt. Seine Wirk- und Aktivierungsmechanismen ähneln den von ACV. Aufgrund der vorhandenen Hydroxylgruppe induziert Penciclovir nicht obligat einen DNA-Strangabbruch [28, 53].

1.5.5 Famciclovir

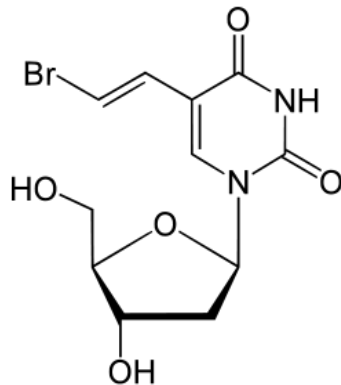
2-[2-(2-Amino-9H-purin-9-yl)ethyl]- 1,3-propandiyl-diacetat



Famciclovir ist der Diazetyylester von Penciclovir und damit ebenso ein Prodrug. Es hat gegenüber PCV eine erhöhte orale Bioverfügbarkeit von 70 %. FCV ist zur oralen Behandlung des akuten Herpes zoster und des primären und rezidivierenden Herpes genitalis zugelassen [53, 109].

1.5.6 Brivudin

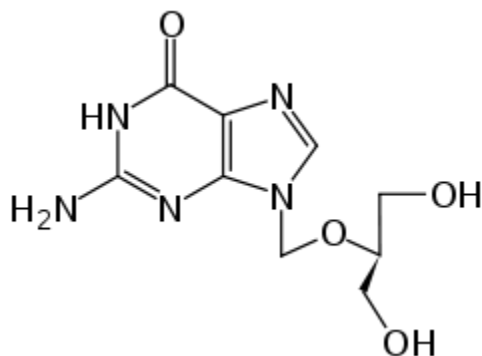
5-[(E)-2-Bromethenyl]-1-[(2R,4S,5R)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)-oxolan-2-yl]pyrimidin-2,4-dion



Brivudin ist ein Nukleosidanalogen mit veränderter Pyrimidinbase aber unveränderter Desoxyribose. Genau wie ACV muss Brivudin durch eine dreifache Phosphorylierung aktiviert werden. Hier werden jedoch die ersten beiden Phosphatreste von der viralen Thymidinkinase angehängt und nur der letzte von einer zellulären Kinase. Auch die Wirkweise als kompetitiver Inhibitor der viralen DNA-Polymerase und der Einbau in die DNA als Alternativsubstrat entspricht der Wirkweise von ACV. ACV-resistente HSV-Isolate sind demzufolge auch BVUD-resistent. Brivudin ist zur oralen Behandlung von HSV Typ 1 und VZV-Infektionen, insbesondere von Herpes zoster geeignet. Gegen HSV Typ 2 ist es unwirksam, da dessen Thymidinkinase nicht in der Lage ist BVUD zu aktivieren [23].

1.5.7 Ganciclovir

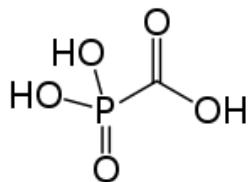
2-[(2-Amino-6-hydroxy-purin-9-yl)-methoxy]-propan-1,3-diol



Ganciclovir ähnelt in seiner Struktur und Wirkungsweise ACV. Im Gegensatz zu diesem kann es jedoch sowohl durch virale als auch durch zelluläre Kinasen aktiviert werden, was zu einer verminderten Selektivität und einer damit höheren Toxizität von GCV führt. Daher ist es nur zur Behandlung und Prophylaxe augenlicht- und lebensbedrohender CMV-Infektionen bei Immunsupprimierten zugelassen. Aufgrund der geringen Resorptionsrate nach oraler Gabe wird GCV intravenös appliziert [32].

1.5.8 Foscarnet

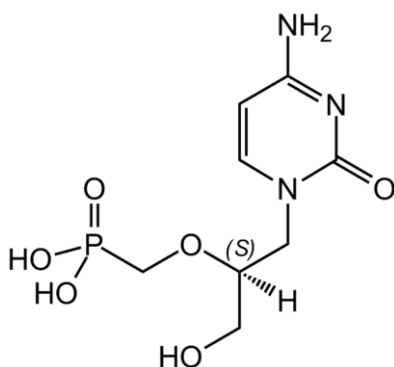
Phosphonoameisensäure



Foscarnet ist ein Pyrophosphatanalogon. Es bindet an die Pyrophosphatbindungsstelle der DNA-Polymerase und blockiert diese. Diese Eigenschaft macht es zu einem Alternativmedikament bei der Behandlung ACV-resistenter Virusstämme bei Immunsupprimierten. Zugelassen ist es jedoch vor allem für die Therapie von schweren CMV-Erkrankungen. Da es extrem nephrotoxisch (bis hin zum Nierenversagen) ist, muss auf eine ausreichende Hydrierung geachtet werden. PFA ist nur als Infusion erhältlich [20, 53].

1.5.9 Cidofovir

(S)-[1-(4-Amino-2-oxo-pyrimidin-1-yl)-3-hydroxy-propan-2-yl]-oxymethylphosphonsäure



Cidofovir ist ein Mononukleotidanalogen. Da es bereits einen Phosphonatrest enthält, benötigt es keine Aktivierung durch die virale Thymidinkinase um die DNA-Polymerase hemmen zu können. Aufgrund seiner ausgeprägten Nephrotoxizität ist es nur zur Behandlung der CMV-Retinitis bei Immunsupprimierten zugelassen. Bei der intravenösen Gabe ist die gleichzeitige Applikation eines Urikosurikums notwendig [24].

1.6 HSV-Infektion und Virostatikaresistenz

Erste Fälle von ACV-resistenten HSV-Stämmen, wurden Anfang der 80er Jahre bei zwei Patienten nach Knochenmarkstransplantation dokumentiert [13]. In epidemiologischen Untersuchungen hat sich jedoch gezeigt, dass trotz des massiv ansteigenden Verbrauchs von ACV die Prävalenz von resistenten HSV-Stämmen gleich bleibt [6]. Bei Immunkompetenten liegt sie zwischen 0,1 % und 0,7 % [6]. Die Prävalenz ACV-resistenter HSV-Stämme bei Immunkomprimierten ist um ein Vielfaches höher. Im Durchschnitt liegt sie bei 4,1-7,1 %, sie kann aber in ausgesuchten Populationen (z. B. Knochenmarks- oder Stammzelltransplantierte) auf bis zu 36 % ansteigen [59]. Es gibt mehrere Gründe für die ausbleibende Verbreitung resistenter Stämme. Mutierte HSV-Stämme sind generell weniger „fit“ als Wildstämme, d. h. ihre Replikationsfähigkeit ist, abhängig von der Art der Mutation, herabgesetzt. Daher sind sie nur in Ausnahmefällen in der Lage, eine Latenz zu etablieren oder zu reaktivieren [18, 50]. Auch die Wahrscheinlichkeit einer Transmission scheint vermindert zu sein, da bisher nur ein Fall bekannt ist, der eine mögliche Übertragung eines ACV-resistenten HSV-Stamms beschreibt [56]. Außerdem ist es immer der Stamm der Primärinfektion, der die lebenslange Latenz etabliert. Eine Superinfektion mit einem resistenten Stamm ist zwar möglich (wenn auch selten), dieser kann jedoch nicht persistieren. Ebenso kann ein während eines Rezidivs selektierter resistenter Stamm mit Ausnahme von wenigen dokumentierten Einzelfällen nicht in das latente Stadium übergehen [6]. Das normalerweise gesunde Immunsystem der Infizierten ist ein weiterer wichtiger Punkt, der dazu beiträgt, die Kumulation und Verbreitung resistenter

HSV-Stämme in der Bevölkerung zu behindern. Immunkompetente können Herpesviren schnell eliminieren und damit verhindern, dass es überhaupt zu einer Selektion eines resistenten Stammes bzw. zu dessen Ausbreitung kommt [6]. Aus diesem Grund sind ACV-resistente HSV-Stämme bisher vor allem bei Immunkomprimierten zu finden und entwickeln auch nur bei ihnen (abgesehen von wenigen Ausnahmen [27, 57]) eine klinische Bedeutung. Das supprimierte Immunsystem ist nicht in der Lage die HSV-Infektion schnell einzudämmen. Dadurch ist es HSV-Stämmen, die eigentlich nur geringfügig pathogen sind, möglich zu persistieren und schwere Schäden anzurichten [81]. Die Entstehung von Resistenzen basiert auf Veränderungen der für die Wirkung von ACV benötigten Enzyme, also der Thymidinkinase (TK, U_L23) und der DNA-Polymerase (DNA-Pol, U_L30) [60]. Phänotypisch äußern sich Resistenzen durch eine verminderte (TK low producer) oder aufgehobene Funktionsfähigkeit der TK (TK deficient). Es können aber auch Änderungen der Substrataffinität der TK (TK altered) und der DNA-Polymerase (DNA-Pol altered) gegenüber ACV-Triphosphat auftreten. Aus allen vier Varianten resultiert die verminderte Wirksamkeit von ACV und meistens auch den Abkömmlingen wie VACV. Die zugrundeliegenden genotypischen Ursachen sind Additionen, Deletionen oder Austausch von Nukleotiden, die sich v. a. innerhalb konservierter aber auch in nichtkonservierten Regionen der TK befinden [106]. Mutationen, die zu Resistenzen führen, entstehen spontan und sehr unregelmäßig während der Replikation unter antiviraler Therapie. Die Applikation antiviraler Substanzen, sowie langandauernde, intensive Immunsuppression verstärken die Selektion schon vorhandener resistenter Stämme [61, 72]. Sie können aber auch bei untherapierten Immunkompetenten nachgewiesen werden [17]. In den meisten Fällen (95 %) sind Mutationen im viralen Thymidinkinasegen für ACV-Resistenzen verantwortlich. Nur 5 % werden durch Mutationen im DNA-Polymerase-Gen verursacht [83]. Dies erklärt sich durch die Tatsache, dass eine funktionierende DNA-Polymerase, im Gegensatz zur TK, essentiell für die Replikation von HSV ist [39]. Zusätzlich zu resistenzvermittelnden Mutationen, weist das HSV-Genom eine hohe Rate an stummen Punktmutationen bzw. Polymorphismen auf [58]. Damit sind Nukleotidaustausche gemeint, die nicht zu

einer Änderung der codierten Aminosäure führen oder trotz einer Änderung keine Auswirkung auf die Funktion des codierten Proteins haben.

1.6.1 U_L 23

Das TK-Gen U_L 23 besteht aus 1128 Basenpaaren (bp) und codiert für die aus 376 Aminosäuren bestehende Thymidinkinase. Man kann innerhalb der TK sechs konservierte Regionen unterscheiden, die sich innerhalb folgender Abschnitte befinden: aa 50-66, 79-91, 162-178, 212-226 und 281-292 [7]. Sie beinhalten drei katalytische Regionen, eine ATP-Bindungsstelle an Position aa 51-63, eine Nukleosidbindungsstelle an Position aa 168-176 und die hochkonservierte aa 336 [41]. Resistenzassoziierte Mutationen im TK-Gen bestehen zu 50 % aus Additionen oder Deletionen von Nukleotiden, die sich oft in homopolymeren Regionen, bestehend aus Cytosin und Guanin, befinden. Die restlichen 50 % sind Punktmutationen [38].

1.6.2 U_L 30

Das DNA-Polymerase-Gen U_L 30 besteht aus 3705 Basenpaaren (bp) und codiert, zusammen mit dem U_L 42-Gen, für die aus 1235 Aminosäuren bestehende DNA-Polymerase [81]. Sie besitzt eine 5'-3' und eine 3'-5' Exonuklease-Funktion, eine RNase H-Funktion, eine katalytische Untereinheit und eine Bindungsstelle für das von U_L 42 codierte Protein [4]. Weiterhin wurden acht konservierte Regionen entdeckt, die nach ihrem Konservierungsgrad (beginnend mit dem höchsten) Region I-VII bezeichnet wurden, während eine weitere Region δ -C (oder A) genannt wurde. Sie befinden sich an folgenden Positionen: I: aa 881-896, II: aa 694-736, III: aa 805-845, IV: aa 437-479, V: aa 953-963, VI: aa 772-791, VII: aa 938-946, δ -C: 577-637 [51, 113]. Insbesondere in den Regionen II und III des DNA-Pol-Gens befinden sich resistenzassoziierte Mutationen. Doppelresistenzen gegenüber ACV und PFA werden regelmäßig durch Mutationen in den Regionen II und VII verursacht [81, 106].

1.7 Nachweis einer Chemotherapeutika-Resistenz

1.7.1 Phänotypische Tests

Die heutzutage am weitesten verbreitete Methode der Suszeptibilitätstestung von Herpes simplex Viren gegenüber Virostatika, ist der Plaquereduktionstest (PRA). Er wurde erstmals 1961 beschrieben [45] und ist der einzige momentan vorhandene Test dessen Ergebnisse mit dem klinischen Verlauf korrelieren [101]. Der PRA basiert darauf, die Reduktion des für HSV charakteristischen zytopathischen Effekts (CPE), abhängig von verschiedenen Virostatikakonzentrationen, in geeigneten Zellen zu bestimmen. Typisch für den CPE sind mikroskopisch sichtbare abgekugelte Zellen, die sich aus dem Epithelverband lösen. Die lytische Replikation der Herpesviren führt zu einer Infektion benachbarter Zellen und es kommt zur Ausbildung einer Plaque. Für den Test wird ein Zellmonolayer mit einer definierten Konzentration an Herpes simplex Virionen infiziert. Um eine Infektion über die in den Medienüberstand ausgeschiedenen Virionen auszuschließen, wird die Zellschicht mit einer gelartigen Substanz (z.B. Methylcellulose) bedeckt. So können sich die Viren nur durch die lytische Infektion von Nachbarzellen verbreiten und auch nur genau da eine Plaque ausbilden, wo initial eine Targetzelle HSV-infiziert wurde. Nach der Adsorption der Viren werden die Zellen mit mehreren Virostatikaverdünnungen für 2-4 Tage inokuliert. Die dann ausgebildeten Plaques werden unter dem Mikroskop ausgezählt und als prozentualer Anteil gegen den \log_{10} der Virostatikakonzentration aufgetragen. Aus dieser Graphik kann dann die Virostatikakonzentration abgelesen werden, bei der die Virusreplikation um 50 % reduziert wird. Dieser Wert wird ID₅₀ oder IC₅₀ genannt. Obwohl der PRA als Goldstandard in der Suszeptibilitätstestung von HSV angesehen wird, hat er einige Nachteile. Er benötigt aufgrund der notwendigen Virusanzüchtung viel Zeit (7-10 Tage) und seine Durchführung und Auswertung sind nicht standardisiert. Außerdem werden die Ergebnisse stark von den Testbedingungen, wie z.B. der verwendeten Zelllinie und der Virusmenge, beeinflusst. Weiterhin können geringe Anteile (<10 %) an resistenten Viren in einer Mischpopulation übersehen werden [11]. Andere bekannte Testvarianten sind der dye uptake assay [92], der DNA-

Hybridisierungstest [102] und der β -Galactosidase-Test [104]. Die genannten Tests werden vor allem im Bereich Screening verwendet, da nur wenige Virusverdünnungen und Virostatikakonzentrationen eingesetzt werden.

1.7.2 Genotypischer Test

Aufgrund der genannten Nachteile der phänotypischen Tests werden große Hoffnungen in die Entwicklung genotypischer Resistenztests gesetzt. Sie sind weniger zeitaufwendig, weshalb es wahrscheinlicher ist, dass ihre Ergebnisse auch tatsächlich die Therapie der Patienten beeinflussen könnten. Genotypische Tests basieren auf dem Vorhandensein von Mutationen im U_L 23-Gen (95 %) und im U_L 30-Gen (5%). Für die Entdeckung der Mutationen wird eine PCR mit nachfolgender Sequenzierung der beiden Gene durchgeführt. Die Auswertung eines genotypischen Tests setzt jedoch voraus, dass man die gefundenen Mutationen als Polymorphismus- oder Resistenzassoziiert einordnen kann.

1.8 Ziel dieser Arbeit

Die Fortschritte der letzten Jahrzehnte auf dem Gebiet der Stammzelltransplantation als Therapiemöglichkeit vor allem für onkologische Patienten haben zu einer steigenden Anzahl der durchgeführten Transplantationen weltweit geführt. Zu den größten Risiken für die Patienten gehören opportunistische Infektionen während der Zeit der Immunsuppression vor und nach der Stammzelltransplantation. Dazu gehören auch ausgedehnte Herpes simplex Infektionen, die die Lebensqualität der Patienten stark beeinträchtigen. Das Mittel der Wahl für die Therapie der Infektionen ist Aciclovir, ein Virostatikum, das mithilfe der viralen Thymidinkinase aktiviert wird und die virale DNA-Synthese unterbricht. Trotz der steigenden Anwendung von ACV sind Resistenzen gegen das Medikament bisher nur bei immunkompromittierten Patienten relevant. Bei allogenen transplantierten Patienten kann der Anteil der resistenten Virusstämme jedoch auf bis zu 36 % ansteigen. Um die Therapie möglichst schnell anpassen zu können, sind schnelle und sichere Tests für die Erkennung von Resistenzen vonnöten.

Bisher ist der Standard in der Resistenztestung der PRA. Aufgrund seiner Nachteile, wie z. B. des hohen Zeitaufwands und der *conditio sine qua non*, nämlich der Verfügbarkeit eines Isolates ist er nur sehr bedingt geeignet Einfluss auf die Therapie zu nehmen. Zurzeit besteht die einzige genotypische Untersuchungsmöglichkeit aus der Sequenzierung der beiden für die Wirkung von ACV wichtigen Gene $U_L 23$ und $U_L 30$. Für die Verwertung der Ergebnisse ist es notwendig zwischen Polymorphismus- und Resistenzassoziierten Mutationen unterscheiden zu können. Diese Aufgabe wird durch den ausgeprägten natürlichen Polymorphismus im HSV-Genom erschwert. Im Vordergrund dieser Arbeit stehen die Sequenzierung des viralen DNA-Polymerasegens $U_L 30$ von schon vorhandenen HSV-Patientenisolaten. Die Isolate wurden bisher phänotypisch mithilfe des PRA auf ihre Virostatikasuszeptibilität getestet und genotypisch auf Mutationen innerhalb des Thymidinkinasegens $U_L 23$ untersucht [74].

2. Material und Methoden

2.1 Gewinnung von HSV-Isolaten

2.1.1 HSV-Isolate von Patienten nach SCT

Die folgende Tabelle enthält eine Übersicht der verwendeten Patientenisolat. Es handelt sich bei allen Isolaten um den HSV Typ 1. Sie wurden freundlicherweise von Niklas Lensch und Elfriede Mikeler, die die Isolate phänotypisch charakterisierten, zur Verfügung gestellt. Die Isolate stammen, mit einer Ausnahme, von Patienten nach Stammzelltransplantation aus den Unikliniken Tübingen und Freiburg [64, 74].

Tab. 2: HSV-Patientenisolat

Ra steht für Rachenspülwasser, La für Lippenabstrich und CA für Carzinom.

Patient	Proben-ID	Eingang	Material	ACV-Empfindlichkeit	Diagnose
1	169612 (1-1)	08.09.2000	Ra	s	Z. v. SZT bei AML
	164511 (1-2)	14.11.2000	La	r	Z. n. SZT bei AML
	170796 (1-3)	28.02.2001	Ra	r	Z. n. SZT bei AML
2	147502 (2-1)	21.05.2001	Ra	r	Z. n. SZT bei AML
	165264 (2-2)	03.07.2001	Ra	r	
	147567 (2-3)	10.09.2001	Ra	s	
	187053 (2-4)	04.10.2001	Ra	s	
3	104224 (3-1)	27.06.2001	Ra	s	Z. n. SZT bei CML
4	147391 (4-1)	10.01.2001	Ra	r	Z. n. SZT bei ALL
	190413 (4-2)	27.08.2001	Ra	r	
	147488 (4-3)	03.09.2001	Ra	r	
5	177015 (5-1)	17.10.2001	Ra	s	Z. n. SZT bei ALL
6	182367 (6-1)	21.11.2001	Ra	s	Z. n. SZT bei NHL
	196157 (6-2)	09.01.2002	La	s	
	196573 (6-3)	16.01.2002	Ra	s	
7	182167 (7-1)	14.11.2001	Ra	r	Z. n. SZT bei ALL
	203923 (7-2)	13.03.2002	Ra	s	
8	205799 (8-1)	26.08.2002	Ra	s	Bronchial - CA
	205794 (8-2)	02.09.2002	Ra	s	
9	232012 (9-1)	02.01.2003	Ra	r	Z. n. SZT bei ALL
	232073 (9-2)	15.01.2003	Ra	r	
	232076 (9-3)	20.01.2003	Ra	r	
10	203144 (10-1)	07.01.2003	Ra	s	Z. n. SZT
11	213812 (11-1)	05.09.2002	Ra	s	Z. n. SZT
	232235 (11-2)	10.02.2003	Ra	s	
	232244 (11-3)	12.02.2003	Ra	s	
12	282270 (12-1)	14.04.2004	Ra	s	Z. n. SZT

	232180 (12-2)	03.05.2004	Ra	s	
13	282422 (13-1) 264017 (13-2) 264030 (13-3)	09.06.2004 14.07.2004 21.07.2004	Ra Ra Ra	s r r	Z. n. SZT bei NHL
14	268910 (14-1) 268909 (14-2) 268913 (14-3) 268921 (14-4)	19.07.2004 19.07.2004 29.07.2004 29.07.2004	Ra Ra Ra Ra	s grenzw. s s r	Z. n. SZT
16	284058 (16-1) 284057 (16-2)	01.01.2004 01.02.2004	Ra La	s s	Z. n. SZT
17	H152 (17-1) H153 (17-2) H238 (17-3)	11.01.2006 24.02.2006 27.03.2006	Ra Ra Ra	s r r	Z. n. SZT
18	H225 (18-1) H227 (18-2)	20.03.2006 23.03.2006	Ra Ra	fragl. r fragl. r	Z. n. SZT

2.1.2 Zellkultur

Vero-Zellen (oder auch african green monkey kidney cells) wurden erstmals 1961 aus dem Nierenparenchym einer erwachsenen afrikanischen grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*) gewonnen. Sie gehören zu den permanenten Zelllinien und bilden einen adhärent wachsenden Monolayer aus. Vero-Zellen eignen sich für die Anzucht von Herpes simplex Viren [47]. Dazu wurden sie in Zellkulturflaschen (CELLSTAR® 250 ml, Greiner Bio-One GmbH) mit 15 ml Minimal Essential Medium (Eagles MEM [1x] + GlutaMAX, + 5 % FCS [Fetales Kälberserum], + PIS [Penicillin/Streptomycin], Invitrogen™) bedeckt und im Brutschrank (37,0°C, 5 % CO₂, 90 % Luftfeuchtigkeit, Inkubator C200, Labotect) aufbewahrt. Nach spätestens 4 Tagen wurden die Zellen entweder mit HSV-Isolaten infiziert oder im Verhältnis 1:2 bis 1:3 gesplittet. Das Zellwachstum wurde alle zwei Tage mikroskopisch beurteilt (Axiovert 25, Carl Zeiss GmbH). Um die Zellen zu splitten, wurde das alte MEM abgenommen und es wurde mit 5 ml Phosphate Buffered Saline (Dulbecco's PBS [1x], PAA Laboratories) nachgespült. Zum Lösen der Zellen vom Flaschenboden wurden 2,5 ml des Enzyms Trypsin (EDTA [1x] PAA Laboratories GmbH) zugegeben und die Flasche wurde für 5 min im Brutschrank inkubiert. Danach wurde die Aktivität des Trypsins durch Zugabe der doppelten Menge an MEM gestoppt.

Durch seitliches Beklopfen der Flasche wurden alle Zellen gelöst und der Erfolg wurde mikroskopisch gesichert. Anschließend wurde der Inhalt in ein Falcon-Röhrchen (BLUE MAX™ 50 ml, Becton Dickinson Labware) überführt und für 4 min bei 1260 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Zell-Pellet wurde je nach Splitverhältnis mit 2 - 3 ml MEM resuspendiert. Die neuen Zellkulturflaschen wurden mit 15 ml MEM vorbereitet und wurden dann mit je 1 ml der Vero-Zellsuspension beimpft.

2.1.3 Infektion mit HSV-Isolaten

Der Mediumüberstand einer Zellkulturflasche wurde verworfen und es wurde mit 5 ml PBS nachgespült. Es wurden 10 ml frisches MEM und 1 ml eines HSV-Isolats hinzugegeben. Die Flasche wurde solange im Brutschrank inkubiert, bis die Vero-Zellen zu 80-100 % durchinfiziert waren. Dann wurde die Zellkulturflasche für mindestens zwei Stunden bei -80°C eingefroren (Hera freeze, Heraeus). Danach wurde sie für etwa 30 min im Brutschrank aufgetaut. Durch Klopfen wurden alle Zellen gelöst und der Inhalt wurde in ein Falcon-Röhrchen überführt und für 8 min bei 3000 g zentrifugiert (Zentrifuge 5804R, Eppendorf). Der Überstand wurde in Portionen von 1 ml aliquotiert (CRYO.S™, Greiner Bio-One GmbH) und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren. Alle Arbeiten wurden an der Sterilbank (BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH) durchgeführt. Weitere verwendete Utensilien waren Einmalpipetten (2, 10, 25 ml, Stripetten®, Corning Incorporated) und ein Pipettenhalter (Easypet, Eppendorf).

2.2 Sequenzierung von U_L30

2.2.1 DNA-Isolierung

Bevor eine PCR durchgeführt werden kann, muss die DNA aus dem Patientenmaterial isoliert werden. Für die DNA-Isolierung wurde das Säulenchromatographie-Set NucleoSpin® der Firma MACHEREY-NAGEL GmbH benutzt. Dabei wird das Prinzip der DNA-Adsorption an eine chaotrope Substanz (hier eine Silicamembran) genutzt. Zuerst wurde das HSV-Isolat lysiert. In ein 1,5 ml Eppendorfcup wurden 200 µl Isolat, 25 µl Proteinase K und

200 µl B3-Puffer gegeben. Es wurde 15 s lang gevortext (Vortexer REAX top, Heidolph) und der Cup wurde für 12 min bei 70°C in einem Thermocycler (Thermomixer comfort, Eppendorf) inkubiert. Anschließend wurden 210 µl Ethanol (99 %, Merck KGaA) hinzugegeben und es wurde erneut gevortext. Dann wurde das Gemisch in ein Säulchen mit Sammelbehälter überführt. Damit sich die DNA in der Säulchenmembran sammelt, wurde für 1 min bei 11.000 g zentrifugiert (Zentrifuge 5415D, Eppendorf). Dann wurde das Säulchen in einen neuen Sammelbehälter gegeben und es folgten zwei Waschgänge. Zuerst wurden 500 µl BW-Puffer hinzupipettiert und es wurde für 1 min bei 11.000 g zentrifugiert. Für den zweiten Waschgang wurden ein neuer Sammelbehälter und 600 µl B5-Puffer benutzt. Zum Trocknen der Säulchenmembran wurde erneut bei 11.000 g für 1 min zentrifugiert. Um die DNA aus der Membran zu lösen, wurde das Säulchen in einem letzten Schritt in ein 1,5 ml Eppendorfcup gestellt und es wurden 50 µl eines auf 70°C vorgewärmten Eluationspuffers hinzugegeben. Das Säulchen wurde 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und zum Schluss wurde für 1 min bei 11.000 g zentrifugiert. Die isolierte DNA wurde nun bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C eingefroren.

2.2.2 U_L30 Fragment-PCR

Die Polymerase-Chain-Reaction (PCR) ist ein Verfahren mit dessen Hilfe DNA-Abschnitte amplifiziert werden können. Man kann sie in drei Phasen unterteilen, die Denaturierung der DNA, die Primeranlagerung (Annealing) und die Primerverlängerung (Elongation). Während der Denaturierung wird die DNA in ihre zwei Einzelstränge geteilt. Anschließend lagern sich die Primer an die DNA an. Jedes Primerpaar wird spezifisch für den gewünschten zu vervielfältigenden DNA-Abschnitt ausgewählt und hat sein eigenes Temperaturoptimum. Der dritte Schritt beinhaltet die Hybridisierung von Nukleotiden und Einzelstrang-DNA. Je öfter diese Schritte wiederholt werden, desto mehr DNA kann entstehen. Es folgt ein abschließender Elongationsschritt bei 72°C. Während dieses Schritts werden die Primer verlängert. Man braucht für die PCR eine Vorlagen-DNA (Matrize), einen Vorwärts- (5'-) und einen Rückwärts- (3'-) Primer, Desoxyribonukleotide, eine hitzestabile DNA-Polymerase, PCR-Puffer, MgSO₄

und Wasser. Weiterhin gibt es unterschiedliche Zusätze, die die Spezifität der Amplifikation erhöhen, wie z.B. sogenannte Enhancer-Lösungen. Eine andere Möglichkeit die Spezifität der PCR zu erhöhen, ist die Einführung eines zusätzlichen Schrittes, des sogenannten Hot Starts. Dabei wird eine spezielle DNA-Polymerase verwendet, die bei niedrigen Temperaturen inaktiv vorliegt. In einem zusätzlichen ersten Schritt wird nun der PCR-Ansatz für etwa 10 min auf 95 - 100°C erhitzt und die Polymerase aktiviert. Man verhindert durch den Hot Start, dass eine unspezifische Primeranlagerung bei niedrigen Temperaturen stattfindet. Im vorliegenden Fall waren 4 unterschiedliche Fragmente zu vervielfältigen, die mithilfe des HotStarTaq DNA Polymerase Sets von Qiagen GmbH amplifiziert wurden. Ein PCR-Ansatz sah wie folgt aus:

18,5	µl H ₂ O
10	µl PCR-Puffer
10	µl Q-Solution
4	µl MgSO ₄
1	µl Forward-Primer
1	µl Reverse-Primer
0,5	µl Hot-Star Taq-Polymerase
5	µl Template-DNA

Für die Amplifikation wurde folgendes Programm verwendet: 15 min bei 95°C, anschließend 35 Zyklen bestehend aus 1 min bei 94°C, 1 min bei 55°C und 1,5 min bei 72°C, abschließend 7 min bei 72°C. Es wurde der Peltier Thermal Cycler 200 von MJ Research Inc. benutzt. Tabelle 3 führt alle verwendeten Primer auf. Die Primerpaare für die Fragmente 1,3 und 4, sowie alle vier Fragment-PCRs wurden nach Sauerbrei et al. [94] angewendet.

Tab 3.: U_L30 PCR- und Sequenzierprimer

Die fett markierten Primer wurden sowohl für die PCR als auch für die Sequenzierung verwendet.

Fragment (Basenpaare)	Primer	Basensequenz 5'-3'	Nukleotide im HSV-Genom
Fragment 1 (1041) nach [94]	1 R4	ATCCGCCAGACAAACAAGGCCCTT CCCCACCCTCGTACTTCTTGATGG	62655- 62678 63695- 63672
Fragment 2 (1044) eigenes Design	2F 2R	GCTCTGTTTTACCGCGTCTAC GATGGTGCGGGTGATGTTA	63603- 63623 64646- 64628
Fragment 3 (1227) nach [94]	3-2 R3	GAAGGACCTGAGCTATCGCGACATC CGTAAAACAGCAGGTTCGACCAGGG	64472- 64496 65744- 65721
Fragment 4 (1043) nach [94]	4 R1	GTAAGATGCTCATCAAGGGCGTGGATC GGCTCATAGACCGGATGCTCAC	65649- 65675 66694- 66673
Sequenzierprimer eigenes Design	seq-2 seq-3	CCGGGTGGCCGTTTACGTTT ATCGGCCGCGAGATGCTGCT	63383- 63402 65325- 65344

2.2.3 Gelelektrophorese

Um zu überprüfen, ob das richtige DNA-Fragment amplifiziert wurde, wurde nach jeder PCR eine Gelelektrophorese durchgeführt. DNA ist aufgrund ihrer vielen Phosphatreste ab einem pH von 7,4 negativ geladen. Gibt man DNA-Fragmente zusammen mit einem Laufpuffer (pH 7,6) in ein Gel und legt eine Spannung an, so wird die DNA, je nach Molekulargewicht des Fragments, unterschiedlich weit in Richtung der Anode transportiert. Zur Bestimmung der Größe des Amplifikats, läuft parallel ein Gewichtsstandard (123 bp DNA Ladder, Invitrogen[®], Life Technologies[™]) mit bekannter Basenzahl mit. Für die Herstellung eines 1,5 %-igen Agarosegels wurden in eine Glasflasche 50 ml TBE-Puffer (Rotiphorese[®], 0,5 %, Carl Roth GmbH) und 0,75 g Agarose (GenAgarose LE, GENAXXON BioScience GmbH; Waage 510, G.Kern & Sohn

Albstadt) gegeben. Die Lösung wurde solange in der Mikrowelle (Mikromat, AEG) erhitzt, bis sie klar war. Dann wurden 0,9 µl Ethidiumbromid (Sigma Life Science®) dazugegeben. Mithilfe eines Gelschlittens (BIO-RAD Laboratories GmbH) und eines Kammes wurde ein Gel gegossen. Sobald das Gel polymerisiert war, wurde es in eine Elektrophoresekammer (BIO-RAD Laboratories GmbH) überführt. Anschließend wurden jeweils 2 µl Laufpuffer (peqLab Biotechnologie GmbH) und 10 µl des zu untersuchenden Materials vermischt. 10 µl dieser Mischung wurden in je eine Tasche gegeben. In die erste Tasche wurde bei jeder Elektrophorese ein Größenstandard von 123 bp eingefüllt. Die anderen Taschen wurden mit den unterschiedlichen Amplifikaten befüllt. Es wurde eine Spannung von 90 Volt über einen Zeitraum von 40 min angelegt. Nach Ablauf der Zeit wurde ein Foto des Gels angefertigt (Gel Doc 2000, BIO-RAD Laboratories GmbH).

2.2.4 Reinigung der PCR-Produkte

Die Reinigung der Amplifikate wurde mithilfe des DNA-Reinigungssets (MACHEREY-NAGEL GmbH) durchgeführt. Zu der Probe wurde die doppelte Menge Bindungspuffer (NT) hinzugegeben. Die Lösung wurde gevortext und kurz anzentrifugiert. Anschließend wurde ein Säulchen beladen und es wurde 1 min bei 11.000 g zentrifugiert. Der Sammelbehälter wurde geleert und es wurden 600 µl Waschpuffer (NT3) hinzugegeben. Nachdem erneut 1 min bei 11.000 g zentrifugiert wurde, wurde der Sammelbehälter wieder entleert und es wurde eine Zentrifugation über 2 min mit 11.000 g durchgeführt. Nun wurde das Säulchen in ein 1,5 ml Eppendorfcup gestellt und es wurden 50 µl Elutionspuffer zugegeben. Danach wurde das Säulchen für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und es wurde 1 min bei 11.000 g zentrifugiert. Die gereinigte DNA konnte nun weiterverwendet werden.

2.2.5 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

Für die DNA-Konzentrationsbestimmung wurde der Photometer ND-1000 (NanoDrop[®] Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific Inc.) benutzt. Das Gerät wurde mit 2 µl RNase-freiem Wasser (Qiagen) vorbereitet. Anschließend wurden 2 µl des vorher verwendeten Elutionspuffers hinzugegeben um dessen Absorption aus der Probe herausrechnen zu können. Dann wurden 2 µl der Probe zugegeben und es konnte der DNA-Gehalt in ng/µl abgelesen werden.

2.2.6 Sequenzier-PCR

In Vorbereitung für die Sequenzierung wurde eine weitere PCR angesetzt mit jeweils nur einem Primer pro Ansatz. Ein Ansatz bestand aus 4 µl Sequenzier-Mix (GenomeLab[™] DTCS-Quick Start Kit, Beckman Coulter), 1 µl DMSO (Dimethylsulfoxid, AppliChem GmbH), 0,5 µl des jeweiligen Primers, sowie DNA. Die DNA-Menge wurde entsprechend des vorher bestimmten DNA-Gehalts festgelegt und es wurde mit Ampuwa (Fresenius Kabi Deutschland GmbH) auf 10 µl aufgefüllt. Das Programm sah wie folgt aus: 1 min bei 95°C und anschließend 29 Zyklen bestehend aus 20 s bei 95°C, 20 s bei 50°C und 3 min bei 60 °C.

2.2.7 DNA-Fällung

Im Anschluss an die Sequenzier-PCR wurde die DNA gefällt. Dafür wurden zu dem PCR-Produkt 5 µl einer Fällungslösung, bestehend aus je 2 Teilen Natriumacetat und EDTA sowie einem Teil Glykogen zugegeben. Zusätzlich wurden 60 µl absoluten Ethanol (99 %, Merck) beigefügt. Es wurde kurz gevortext und anschließend 15 min bei 13.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, während das entstandene DNA-Pellet möglichst nicht berührt werden sollte. Es wurden 200 µl Ethanol (80 %, Merck) zugegeben und es wurde 5 min bei 13.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und es wurde für 2 min bei 13.000 g zentrifugiert. Nachdem ein weiteres Mal der Überstand abgenommen wurde, wurde nun in einer Vacuum-Zentrifuge (Vacufuge[™], Eppendorf) für 10 min bei 30 °C zum Trocknen zentrifugiert.

2.2.8 Sequenzierung

Die gefällte DNA wurde in 30 µl SLS (Sample loading solution) gelöst und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde kurz gevortext und anzenrifugiert und das gelöste Pellet wurde auf eine 96-well-Platte aufgetragen. Es wurde 1 Tropfen Mineralöl (Sigma-Aldrich Co. LLC) dazugegeben. Nun konnte die Probe mithilfe des Sequenzierers CEQTM 8000 Genetic Analysis System (Beckmann Coulter, Inc.) im Institut für Virologie und Antivirale Therapie in Jena analysiert werden. Ein Großteil der Proben wurde jedoch zur Sequenzierung nach Berlin an die Firma LGC Genomics gesendet. Zur Vorbereitung wurde der DNA-Gehalt der Proben auf 20 ng/µl eingestellt, mittels Verdünnung mit Ampuwa. Die zu verwendenden Primer wurden auf eine Konzentration von 20 pmol/µl eingestellt und an LGC Genomics gesendet. Die Firma benutzt das Gerät Abi Prism 3730 XL und verwendet die traditionelle Strangabbruchmethode nach Sanger et al [92]. Diese Methode funktioniert ähnlich wie eine PCR. Es wird jedoch jeweils nur ein Primer pro Ansatz verwendet und es kommen zusätzlich zu den normalen Nukleotiden solche zum Einsatz, die keine 3'-OH-Gruppe haben (ddNTPs) und mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Ausgehend von dem Primer verlängert eine Polymerase den Matrizenstrang soweit, bis sie auf ein ddNTP stößt. Aufgrund der fehlenden OH-Gruppe bricht der DNA-Strang dort ab. Auf diese Art und Weise entstehen DNA-Fragmente unterschiedlichster Länge, an deren Ende jeweils ein markiertes Nukleotid sitzt. Mittels Kapillarelektrophorese werden die Fragmente nach ihrer Länge geordnet. Anschließend werden die Farbstoffe über einen Laser zum fluoreszieren angeregt. Ein Detektor empfängt die Farbsignale und setzt daraus das sogenannte Elutions-Chromatogramm zusammen.

2.3 Auswertung der Ergebnisse

Für die Auswertung der Sequenzen wurde das Programm Geneious Pro trial 5.5.2 (Biomatters Ltd.) verwendet. Dazu importiert man die einzelnen Chromatogramme und die Sequenz des Vergleichsvirus in die Datenbank. Geneious erstellt nun eine fortlaufende Sequenz des jeweiligen Patientenisolats, die mit der Vergleichssequenz abgeglichen werden kann. Weiterhin kann man sich die Basenabfolge in die Aminosäuresequenz übersetzen lassen um auch dort nach fehlenden Übereinstimmungen zu suchen. Der komplette Text und die Grafiken der vorliegenden Arbeit wurden, wenn nicht anders erwähnt, mithilfe von Word (Microsoft Office Word 2003) erstellt.

3. Ergebnisse

Die Sequenzierung des U_L 30 Gens konnte bei allen 42 Isolaten erfolgreich durchgeführt werden. Es handelte sich bei allen Isolaten, um den Herpes simplex Virus Typ 1. Zusätzlich zu den explizit für diese Arbeit gewonnenen Ergebnissen der U_L 30-Sequenzierung wurden auch Teile der Sequenzierungsergebnisse des U_L 23-Gens dargestellt. Um eine übersichtliche Darstellung der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden die Ergebnisse der beiden Gene parallel in einer Tabelle zusammengefasst. Es soll aber ausdrücklich darauf hingewiesen werden, dass nur die Ergebnisse der U_L 30-Sequenzierung im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstellt wurden. Alle Daten, die das U_L 23-Gen betreffen, wurden von Kristina Moritz [74] erarbeitet. Die Daten bezüglich des Phänotypus basieren auf Vorarbeiten von Niklas Lensch [64] und Elfriede Mikeler.

Patient 1

Von Patient 1 standen 3 Isolate zur Verfügung, die in einem Zeitraum von einem halben Jahr abgenommen wurden. Das erste Isolat war ACV-sensitiv, die zwei folgenden Isolate waren beide ACV-resistent. Alle 3 Isolate wiesen dieselben 16 U_L 30-Mutationen auf. Davon waren 5 Polymorphismen und 11 stumme Punktmutationen.

Tab. 3: Übersicht der U_L 23 und U_L 30-Mutationen der Isolate von Patient 1
Basenänderungen sind fett dargestellt

Patienten-ID/ Entnahmedatum	Stumme Mutation U _L 30	Polymorphismus U _L 30	Resistenzassoziierte Mutation		Phänotyp
			U _L 23	U _L 30	
169612	TGT→ TGC nt. 117	AGC→ GGC S33G	n.n.	n.n.	sensibel
(1-1)	ATC→ ATA nt. 525	GCG→ CGG A330R			ID 100 <
08.09.2000	CGT→ CGC nt. 831	GCC→ ACC A1099T			1 µg/ml
	ATC→ ATT nt. 1839	TCC→ TGC S1113C			
	AGG→ CGG nt. 2074	CCT→ CAT P1124H			
	GGG→ GGA nt. 2277				
	GTG→ GTT nt. 2450				
	ATC→ ATA nt. 2670				
	GGT→ GGC nt. 2844				
	GTC→ GTA nt. 2949				
	GCG→ GCA nt. 2985				
164511 (1-2) 14.11.2000	s.o.	s.o.	Q104Stop	n.n.	resistent ID 100 = 100 µg/ml
170796 (1-3) 28.02.2001	s.o.	s.o.	Q104Stop	n.n.	resistent ID 100 > 500 µg/ml

Patient 2

Es wurden 4 Isolate von Patient 2 untersucht. Die ersten beiden Isolate waren phänotypisch resistent, während die beiden 4 bzw. 5 Monate späteren Isolate sensitiv gegenüber ACV waren. Alle 4 Isolate besaßen jeweils die gleichen 6 stummen Punktmutationen und 6 Polymorphismen. Die Resistenz des Isolates B2 wurde durch eine Mutation im U_L 23-Gen erklärt, während für das phänotypisch resistente Isolat B1 keine resistenzassoziierte Mutation gefunden wurde. Das phänotypisch sensible Isolat 2-4 hingegen wies eine noch unbekannte resistenzassoziierte Mutation im U_L 23-Gen auf.

Die Ergebnisse der initialen phänotypischen Testung werden derzeit nochmals überprüft, da Diskrepanzen zwischen dem Phäno- und dem Genotyp (Isolat 2-4) vorliegen.

Tab. 4: Übersicht der U_L 23 und U_L 30-Mutationen der Isolate von Patient 2
Basenänderungen sind fett dargestellt

Patienten-ID/ Entnahmedatum	Stumme Mutation U _L 30	Polymorphismus U _L 30	Resistenzassoziierte Mutation		Phänotyp
			U _L 23	U _L 30	
147502	TGT→ TGC nt. 117	AGC→ GGC S33G	n.n.	n.n.	resistent
(2-1)	CGT→ CGC nt. 831	GCG→ CGG A330R			ID 100 =
21.05.2001	AGG→ CGG nt. 2074	AAC→ ACC N425T			500 µM
	ATC→ ATA nt. 2670	CCC→ TCC P875S			
	GCG→ GCA nt. 2985	GTG→ ATG V905M			
	GAC→ GAT nt. 3290	CCT→ CAT P1124H			
165264 (2-2) 03.07.2001	s.o.	s.o.	Del. C nt. 548	s.o.	resistent ID 100 > 500 µM
147567 (2-3) 10.09.2001	s.o.	s.o.	n.n.	s.o.	sensibel
187053 (2-4) 04.10.2001	s.o.	s.o.	Del. A nt. 232	s.o.	sensibel

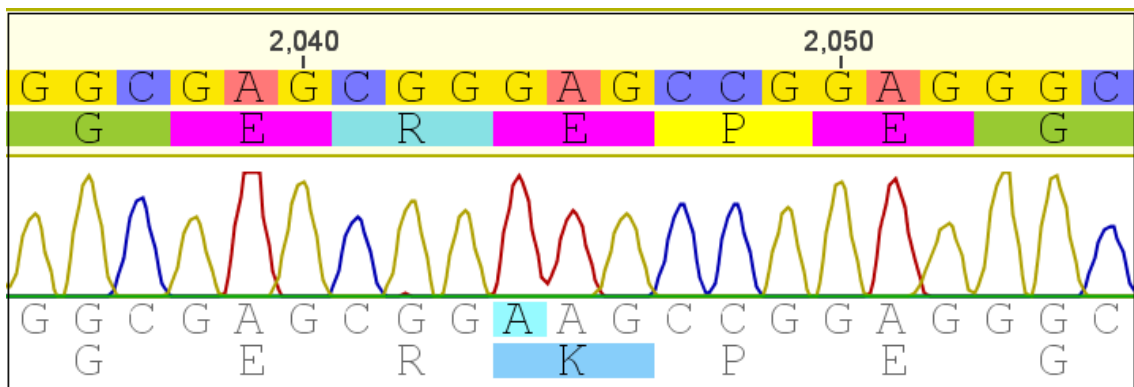
Patient 3

Von Patient 3 gab es ein ACV-sensitives Isolat. Das U_L 30-Gen wies 7 stumme Punktmutationen sowie 7 Polymorphismen auf. Die Punktmutation L267M wurde bisher nur als möglicherweise dem natürlichen Polymorphismus zugeordnet in der Literatur erwähnt. Die Mutation E682K ist bisher nicht beschrieben worden.

Tab. 5: Übersicht der U_L 23 und U_L 30-Mutationen der Isolate von Patient 3 Basenänderungen sind fett dargestellt. Bisher unbekannte Polymorphismen sind fett und kursiv markiert.

Patienten-ID/ Entnahmedatum	Stumme Mutation U _L 30	Polymorphismus U _L 30	Resistenzassoziierte Mutation		Phänotyp
			U _L 23	U _L 30	
104224	TGT→TGC nt. 117	AGC→GGC S33G	n.n.	n.n.	sensibel
(3-1)	CGT→CGC nt. 831	CTG→ATG L267M			ID 100 =
27.06.2001	AGG→CGG nt. 2074	GCG→CGG A330R			3,9 μM
	ATC→ATA nt. 2670	GAG→AAG E682K			
	CGG→AGG nt. 3210	GTG→ATG V905M			
	CGG→CGA nt. 3267	CCT→CAT P1124H			
	CCC→CAC nt. 3276	ACC→GCC T1208A			

Abb. 5 Ausschnitt aus dem Elutionsdiagramm der U_L 30-Sequenzierung des Isolats 104224 in einem Alignment mit dem U_L 30-Genom vom Referenzstamm Strain 17, hervorgehoben ist der bisher unbekannte Polymorphismus E682K



Patient 4

Von Patient 4 standen 3 sequentielle Isolate zur Verfügung, die alle resistent gegenüber ACV waren. Das Isolat 147391 wies 4 Polymorphismen und 9 stumme Punktmutationen auf. Die beiden folgenden Isolate 190413 und 147488 wiesen einen zusätzlichen Polymorphismus und eine unterschiedliche stumme Punktmutation auf. Die Mutation L438M ist bisher noch nicht beschrieben worden.

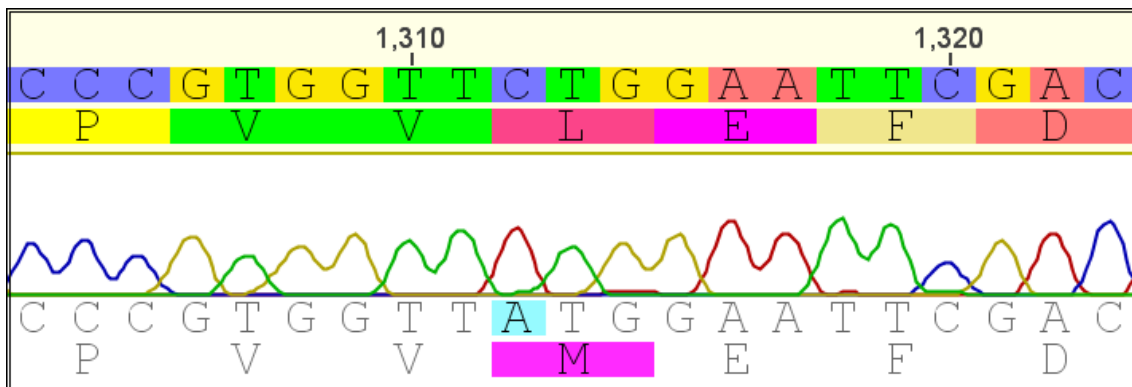
Tab. 6: Übersicht der U_L 23 und U_L 30-Mutationen der Isolate von Patient 4. Basenänderungen sind fett dargestellt. Bisher unbekannte Polymorphismen sind fett und kursiv markiert.

Patienten-ID/ Entnahmedatum	Stumme Mutation U _L 30	Polymorphismus U _L 30	Resistenzassoziierte Mutation		Phänotyp
			U _L 23	U _L 30	
147391	CGT→ CGC nt. 831	GCG→ CGG A330R	Add. G nt. 430	n.n.	resistent
(4-1)	AAG→ AAA nt. 1434	AAC→ ACC N425T			ID 100
10.01.2001	CTG→ TTG nt. 1876	CTG→ ATG L438M			n.b.
	AGG→ CGG nt. 2074	GTG→ ATG V905M			
	ATC→ ATA nt. 2670				
	GTC→ GTA nt. 2949				
	GCG→ GCA nt. 2985				
	GCG→ GCT nt. 3507				
	ATC→ ATT nt. 3522				
190413	CGT→ CGC nt. 831	GCG→ CGG A330R	Add. G nt. 430	n.n.	resistent
(4-2)	AAG→ AAA nt. 1434	AAC→ ACC N425T			ID 100 >
27.08.2001	CTG→ TTG nt. 1876	CTG→ ATG L438M			500 µM
	AGG→ CGG nt. 2074	GTG→ ATG V905M			
	ATC→ ATA nt. 2670	ACC→ GCC T1208A			
	GTC→ GTA				

Ergebnisse

	nt. 2949				
	GCG→GCA nt. 2985				
	GCG→GCT nt. 3507				
	ATC→ATT nt. 3549				
147488 (4-3) 03.09.2001	siehe 4-2	siehe 4-2	siehe 4-2	siehe 4-2	siehe 4-2

Abb. 6 Ausschnitt aus dem Chromatogramm der U_L 30-Sequenzierung des Isolats 147391 in einem Alignment mit dem U_L 30-Genom vom Referenzstamm Strain 17, hervorgehoben ist der bisher unbekannte Polymorphismus L438M



Patient 5

Das ACV-sensible Isolat 177015 von Patient 5 wies in der genotypischen Untersuchung des U_L 30-Gens 8 stumme Punktmutationen sowie 4 Polymorphismen auf.

Tab. 7 Übersicht der U_L 23 und U_L 30-Mutationen der Isolate von Patient 5
Basenänderungen sind fett dargestellt.

Patienten-ID/ Entnahmedatum	Stumme Mutation U _L 30	Polymorphismus U _L 30	Resistenzassoziierte Mutation		Phänotyp
			U _L 23	U _L 30	
177015	GGC →GGT nt. 18	AGC→ GGC S33G	n.n.	n.n.	sensibel
(5-1)	TGT →TGC nt. 117	GCG→ CGG A330R			ID 100 =
17.10.2001	ATC →ATA nt. 525	GTG→ ATG V905M			3,9 µM
	CGT →CGC nt. 831	ACC→ GCC T1208A			
	ACC →ATC nt. 1269				
	AGG→ CGG nt. 2074				
	ATC →ATA nt. 2670				
	GCG →GCA nt. 2985				

Patient 6

Es waren 3 Isolate von Patient 6 vorhanden, die sensibel gegenüber ACV waren. Sie wiesen alle 3 die gleichen 5 Polymorphismen und 8 stummen Punktmutationen auf.

Tab. 8 Übersicht der U_L 23 und U_L 30-Mutationen der Isolate von Patient 6
Basenänderungen sind fett dargestellt.

Patienten-ID/ Entnahmedatum	Stumme Mutation U _L 30	Polymorphismus U _L 30	Resistenzassoziierte Mutation		Phänotyp
			U _L 23	U _L 30	
182367	GTC→ GTT nt. 636	AGC→ GGC S33G	n.n.	n.n.	sensibel
(6-1)	CGT→CGC nt. 831	GCG→ CGG A330R			ID100 =
21.11.2001	TTC→TTT nt. 1320	GTG→ ATG V905M			4μM
	AGG→CGG nt. 2074	CCT→ CAT P1124H			
	CAC→CAT nt. 2496	ACC→ GCC T1208A			
	ATC→ATA nt. 2670				
	GTC→GTA nt. 2949				
	GCG→GCA nt. 2985				
196157 (6-2) 09.01.2002	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.
196573 (6-3) 16.01.2002	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.

Patient 7

Die 2 Isolate von Patient 7 waren ACV-resistent (182167) bzw. grenzwertig sensibel (203923). In der genotypischen Untersuchung wurden bei beiden Isolaten die gleichen 6 stummen Punktmutationen und 5 Polymorphismen gefunden.

Die Ergebnisse der initialen phänotypischen Testung werden derzeit nochmals überprüft, da Diskrepanzen zwischen dem Phäno- und dem Genotyp (Isolat 7-2) vorliegen.

Tab. 9 Übersicht der U_L 23 und U_L 30-Mutationen der Isolate von Patient 7
Basenänderungen sind fett dargestellt.

Patienten-ID/ Entnahmedatum	Stumme Mutation U _L 30	Polymorphismus U _L 30	Resistenzassoziierte Mutation		Phänotyp
			U _L 23	U _L 30	
182167	GTC→ GTT nt. 636	AGC→ GGC S33G	Add. G nt. 430	n.n.	resistent
(7-1)	CGT→ CGC nt. 831	GCG→ CGG A330R			ID100 >
14.11.2001	AGG→ CGG nt. 2074	GTG→ ATG V905M			500 µM
	ATC→ ATA nt. 2670	CCT→ CAT P1124H			
	GTC→ GTA nt. 2949	ACC→ GCC T1208A			
	GCG→ GCA nt. 2985				
203923 (7-2) 13.03.2002	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.	grenzw. sensibel ID 100 = 15,6 µM

Patient 8

Von Patient 8 waren 2 ACV-sensible Isolate vorhanden. Sie zeigten die gleichen 9 stummen Punktmutationen, sowie 5 Polymorphismen.

Tab. 10 Übersicht der U_L 23 und U_L 30-Mutationen der Isolate von Patient 8
Basenänderungen sind fett dargestellt.

Patienten-ID/ Entnahmedatum	Stumme Mutation U _L 30	Polymorphismus U _L 30	Resistenzassoziierte Mutation		Phänotyp
			U _L 23	U _L 30	
205799	CCG→ CCC nt. 174	AGC→ GGC S33G	n.n.	n.n.	sensibel
(8-1)	GGT→ GGC nt. 291	GCG→ CGG A330R			ID 100
26.08.2002	TAC→ TAT nt. 450	GCC→ ACC A562T			n.b.
	GTC→ GTT nt. 636	GAC→ AAC D672N			
	CGT→ CGC nt. 831	GTG→ ATG V905M			
	AGG→ CGG nt. 2074				
	ATC→ ATA nt. 2670				
	GTC→ GTA nt. 2949				
	GCG→ GCA nt. 2985				
205794 (8-2) 02.09.2002	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.

Patient 9

Es wurden 3 Isolate von Patient 9 untersucht. Das erste Isolat war noch grenzwertig resistent gegenüber ACV, während die 2 bzw. 3 Wochen später abgenommenen Isolate eindeutig resistent waren. Alle 3 Isolate wiesen die gleichen 11 stummen Punktmutationen und 5 Polymorphismen auf.

Tab. 11 Übersicht der U_L 23 und U_L 30-Mutationen der Isolate von Patient 9. Basenänderungen sind fett dargestellt.

Patienten-ID/ Entnahmedatum	Stumme Mutation U _L 30	Polymorphismus U _L 30	Resistenzassoziierte Mutation		Phänotyp
			U _L 23	U _L 30	
232012	TAC→TAT nt. 450	AGC→GGC S33G	I78F	n.n.	grenzw. resistent
(9-1)	GTC→GTT nt. 636	GCG→CGG A330R			
02.01.2003	CGT→CGC nt. 831	GAC→AAC D672N			ID 100 =
	GAC→GAT nt. 1020	GTG→ATG V905M			15 µM
	GCC→GCA nt. 1140	CCC→TCC P920S			
	AGG→CGG nt. 2074				
	ATC→ATA nt. 2670				
	CTG→CTA nt. 2805				
	GTC→GTA nt. 2949				
	GCG→GCA nt. 2985				
	GGA→GGC nt. 3018				
232073 (9-2) 15.01.2003	s.o.	s.o.	I78F W88Stop	s.o.	resistent ID 100 > 500 µM
232076 (9-3) 20.01.2003	s.o.	s.o.	I78F	s.o.	resistent ID 100 > 500 µM

Patient 10

Das einzige von Patient 10 untersuchte Isolat war sensibel gegenüber ACV. Die genotypische Untersuchung wies 6 Polymorphismen und 8 stumme Mutationen auf.

Tab. 12 Übersicht der U_L 23 und U_L 30-Mutationen der Isolate von Patient 10
Basenänderungen sind fett dargestellt.

Patienten-ID/ Entnahmedatum	Stumme Mutation U _L 30	Polymorphismus U _L 30	Resistenzassoziierte Mutation		Phänotyp
			U _L 23	U _L 30	
203144	TAC→ TAT nt. 450	AGC→ GGC S33G	n.n.	n.n.	sensibel
(10-1)	GTC→ GTT nt. 636	GCG→ CGG A330R			ID 100 =
07.01.2003	CGT→ CGC nt. 831	GCC→ ACC A562T			3,9 µM
	AGG→ CGG nt. 2074	GAC→ AAC D672N			
	ATC→ ATA nt. 2670	GTG→ ATG V905M			
	CTG→ CTA nt. 2805	CCC→ TCC P920S			
	GTC→ GTA nt. 2949				
	GCG→ GCA nt. 2985				

Patient 11

Es standen 3 sequentielle Isolate von Patient 11 zur Verfügung. Sie waren alle empfindlich gegenüber ACV. Das U_L 30-Gen wies jeweils die gleichen 7 stummen Punktmutationen und 6 Polymorphismen auf.

Tab. 13 Übersicht der U_L 23 und U_L 30-Mutationen der Isolate von Patient 11
Basenänderungen sind fett dargestellt.

Patienten-ID/ Entnahmedatum	Stumme Mutation U _L 30	Polymorphismus U _L 30	Resistenzassoziierte Mutation		Phänotyp
			U _L 23	U _L 30	
213812	GTC→ GTT nt. 636	AGC→ GGC S33G	n.n.	n.n.	sensibel
(11-1)	CGT→ CGC nt. 831	GCG→ CGG A330R			ID 100
05.09.2002	ATC→ ATT nt. 1569	GTG→ ATG V905M			> 6,5 µM
	AGG→ CGG nt. 2074	GAG→ GAT E1104D			
	ATC→ ATA nt. 2670	CCT→ CAT P1124H			
	GTC→ GTA nt. 2949	ACC→ GCC T1208A			
	GCG→ GCA nt. 2985				
232235 (11-2) 10.02.2003	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.	sensibel ID 100 n.b.
232244 (11-3) 12.02.2003	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.	sensibel ID 100 < 2 µM

Patient 12

Die beiden von Patient 12 vorhandenen Isolate waren ACV-sensibel. Sie wiesen die gleichen 8 stummen Punktmutationen, sowie 4 Polymorphismen auf.

Tab. 14 Übersicht der U_L 23 und U_L 30-Mutationen der Isolate von Patient 12
Basenänderungen sind fett dargestellt.

Patienten-ID/ Entnahmedatum	Stumme Mutation U _L 30	Polymorphismus U _L 30	Resistenzassoziierte Mutation		Phänotyp
			U _L 23	U _L 30	
282270	TAC→ TAT nt. 450	AGC→ GGC S33G	n.n.	n.n.	sensibel
(12-1)	GTC→ GTT nt. 636	GCG→ CGG A330R			ID 50 <
14.04.2004	CGT→ CGC nt. 831	GAC→ AAC D672N			0,31 µM
	AGG→ CGG nt. 2074	GTG→ ATG V905M			
	ATC→ ATA nt. 2670				
	CTG→ CTA nt. 2805				
	GTC→ GTA nt. 2949				
	GCG→ GCA nt. 2985				
232180 (12-2) 03.05.2004	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.	sensibel ID 50 < 0,62 µM

Patient 13

Es waren 3 sequentielle Isolate von Patient 13 vorhanden. Das erste Isolat war noch empfindlich gegenüber ACV, die beiden 5 bzw. 6 Wochen später abgenommenen Isolate waren jedoch resistent. Alle 3 Isolate wiesen die gleichen 11 stummen Punktmutationen und 4 Polymorphismen auf.

Tab. 15 Übersicht der U_L 23 und U_L 30-Mutationen der Isolate von Patient 13. Basenänderungen sind fett dargestellt.

Patienten-ID/ Entnahmedatum	Stumme Mutation U _L 30	Polymorphismus U _L 30	Resistenzassoziierte Mutation		Phänotyp
			U _L 23	U _L 30	
282422	TAC→TAT nt. 450	AGC→ GGC S33G	n.n.	n.n.	sensibel
(13-1)	GTC→GTT nt. 636	GCG→ CGG A330R			ID 50 <
09.06.2004	CGT→ CGC nt. 831	GAC→ AAC D672N			0,31 µM
	GAC→GAT nt. 1020	GTG→ ATG V905M			
	AGG→ CGG nt. 2074				
	AGC→AGT nt. 2172				
	CAG→CAA nt. 2583				
	ATC→ATA nt. 2670				
	CTG→CTA nt. 2805				
	GTC→GTA nt. 2949				
	GCG→GCA nt. 2985				
264017 (13-2) 14.07.2004	s.o.	s.o.	Del. C nt. 666	n.n.	resistent ID 50 > 5 µM
264030 (13-3) 21.07.2004	siehe 13-2	siehe 13-2	siehe 13-2	siehe 13-2	siehe 13-2

Patient 14

Es standen 4 Isolate von Patient 14 zur Verfügung, von denen jeweils 2 am selben Tag mit 10 Tagen Abstand gewonnen wurden. Die Isolate 268910 und 268913 waren definitiv sensibel gegenüber ACV, während die parallel abgenommenen Isolate fraglich resistent (268909) bzw. eindeutig resistent (268921) waren. Alle 3 Isolate wiesen im U_L 30-Gen die gleichen 7 stummen Punktmutationen auf und 8 Polymorphismen. Das Isolat 268909 wies zusätzlich noch die resistenzassoziierte Mutation A719V auf. Die Polymorphismen D741N, I755F und T1121M sind bisher in der Literatur unbekannt.

Die Ergebnisse der initialen phänotypischen Testung werden derzeit nochmals überprüft, da Diskrepanzen zwischen dem Phäno- und dem Genotyp (Isolat 14-2) vorliegen.

Tab. 16 Übersicht der U_L 23 und U_L 30-Mutationen der Isolate von Patient 14
Basenänderungen sind fett dargestellt. Bisher unbekannte Polymorphismen sind fett und kursiv markiert.

Patienten-ID/ Entnahmedatum	Stumme Mutation U _L 30	Polymorphismus U _L 30	Resistenzassoziierte Mutation		Phänotyp
			U _L 23	U _L 30	
268910	GTC→GTT nt. 636	AGC→GGC S33G	n.n.	n.n.	sensibel
(14-1)	CGT→CGC nt. 831	GCG→CGG A330R			ID 50 <
19.07.2004	AGG→CGG nt. 2074	GAC→AAC D741N			0,3 µM
	CTG→CTA nt. 2214	ATC→TTC I755F			
	ATC→ATA nt. 2670	GTG→ATG V905M			
	GTC→GTA nt. 2949	ACG→ATG T1121M			
	GCG→GCA A nt. 2985	CCT→CAT P1124H			
		ACC→GCC T1208A			
268909	GTC→GTT	AGC→GGC	n.n.	TGC→TG	resistent

Ergebnisse

(14-2) 19.07.200 4	nt. 636	S33G		T A719V	
	CGT→CGC nt. 831	GCG→CGG A330R			ID 50 >
	AGG→CG G nt. 2074	GAC→AAC D741N			2,5 µM
	CTG→CTA nt. 2214	ATC→TTC I755F			
	ATC→ATA nt. 2670	GTG→ATG V905M			
	GTC→GTA nt. 2949	ACG→ATG T1121M			
	GCG→GC A nt. 2985	CCT→CAT P1124H			
		ACC→GCC T1208A			
268913 (14-3) 29.07.200 4	siehe 14-1	siehe 14-1	n.n.	n.n.	sensibel ID 50 < 1,25 µM
268921 (14-4) 29.07.200 4	siehe 14-1	siehe 14-1	R222H	n.n.	resistent ID 50 > 5 µM

Abb. 7 Ausschnitt aus dem Chromatogramm der U_L 30-Sequenzierung des Isolats 268910 in einem Alignment mit dem U_L 30-Genom vom Referenzstamm Strain 17, hervorgehoben ist der bisher unbekannte Polymorphismus D741N, sowie eine stille Punktmutation bei nt. 2214

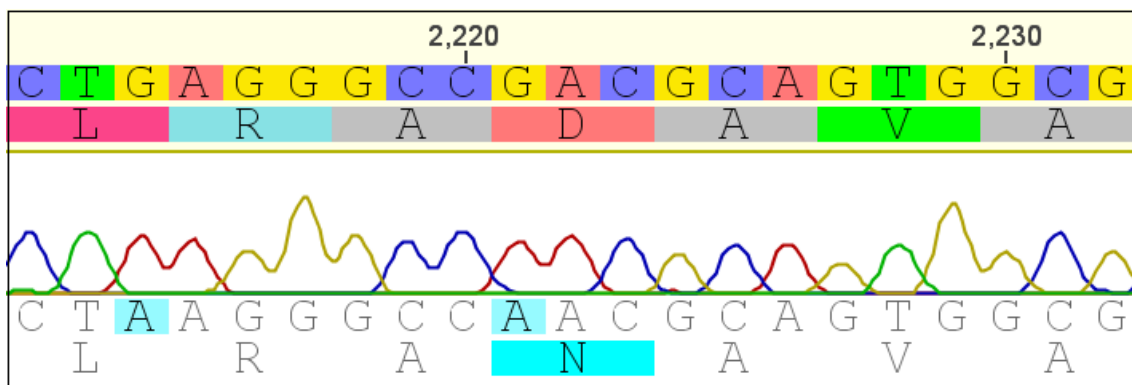


Abb. 8 Ausschnitt aus dem Chromatogramm der U_L 30-Sequenzierung des Isolats 268910 in einem Alignment mit dem U_L 30-Genom vom Referenzstamm Strain 17, hervorgehoben ist der bisher unbekannte Polymorphismus I755F

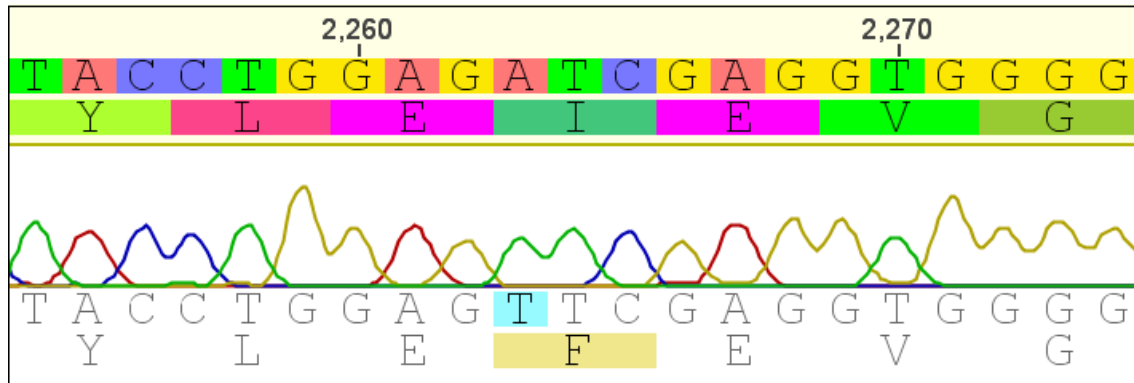


Abb. 9 Ausschnitt aus dem Chromatogramm der U_L 30-Sequenzierung des Isolats 268910 in einem Alignment mit dem U_L 30-Genom vom Referenzstamm Strain 17, hervorgehoben ist der bisher unbekannte Polymorphismus T1121M, sowie der schon bekannte Polymorphismus P1124H

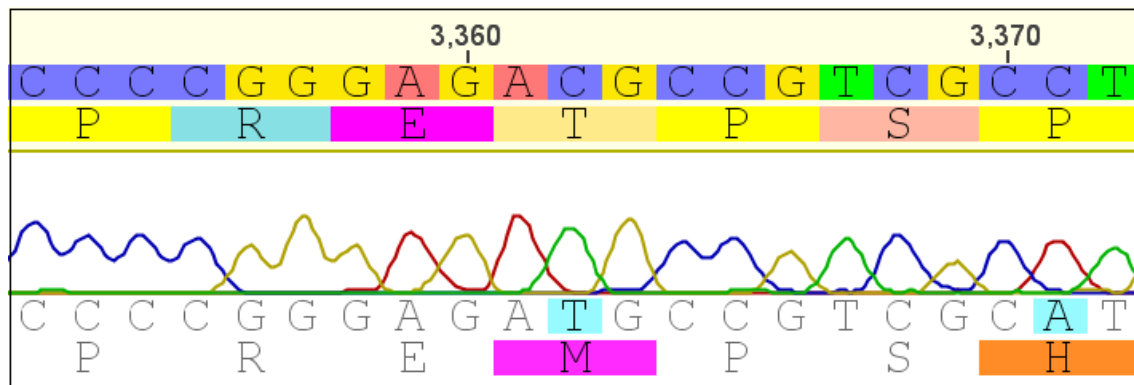
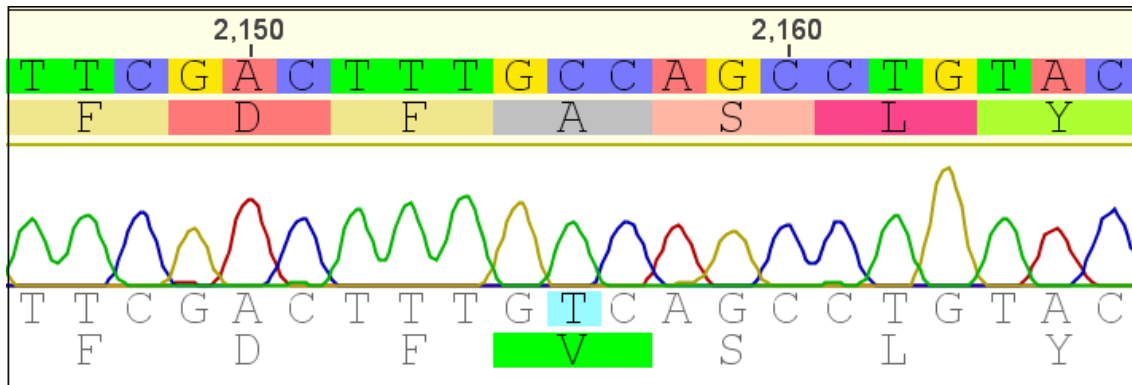


Abb. 10 Ausschnitt aus dem Chromatogramm der U_L 30-Sequenzierung des Isolats 268909 in einem Alignment mit dem U_L 30-Genom vom Referenzstamm Strain 17, hervorgehoben ist die schon bekannte resistenzassoziierte Mutation A719V



Patient 16

Von Patient waren 2 Isolate vorhanden, die beide ACV-empfindlich waren. Sie wiesen die gleichen 9 stummen Punktmutationen und 4 Polymorphismen auf.

Tab. 18 Übersicht der U_L 23 und U_L 30-Mutationen der Isolate von Patient 16
Basenänderungen sind fett dargestellt.

Patienten-ID/ Entnahmedatum	Stumme Mutation U _L 30	Polymorphismus U _L 30	Resistenzassoziierte Mutation		Phänotyp
			U _L 23	U _L 30	
284058	TAC→TAT nt. 450	AGC→GGC S33G	n.n.	n.n.	sensibel
(16-1)	GTC→GTT nt. 636	GCG→CGG A330R			ID
01.01.2004	CGT→CGC nt. 831	GAC→AAC D672N			n.b.
	AGG→CGG nt. 2074	GTG→ATG V905M			
	CAG→CAA nt. 2583				
	ATC→ATA nt. 2670				
	CTG→CTA nt. 2805				
	GTC→GTA nt. 2949				
	GCG→GCA nt. 2985				
284057 (16-2) 01.02.2004	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.

Patient 17

Von Patient 17 waren drei sequentielle Isolate vorhanden, von denen das erste Isolat ACV-sensibel war. Die beiden später abgenommenen Isolate waren resistent gegenüber ACV. Alle drei wiesen die gleichen 10 stummen Punktmutationen und 5 Polymorphismen auf.

Tab. 19 Übersicht der U_L 23 und U_L 30-Mutationen der Isolate von Patient 17 Basenänderungen sind fett dargestellt.

Patienten-ID/ Entnahmedatum	Stumme Mutation U _L 30	Polymorphismus U _L 30	Resistenzassoziierte Mutation		Phänotyp
			U _L 23	U _L 30	
H152	TAC→TAT nt. 450	AGC→ GGC S33G	n.n.	n.n.	sensibel
(17-1)	GTC→GTT nt. 636	GCG→ CGG A330R			ID 50 n.b.
11.01.2006	CGT→ CGC nt. 831	GAC→ AAC D672N			
	GAC→GAT nt. 1020	GTG→ ATG V905M			
	AGG→ CGG nt. 2074	ACC→ GCC T1208A			
	CAG→ CAA nt. 2583				
	ATC→ ATA nt. 2670				
	CTG→ CTA nt. 2805				
	GTC→ GTA nt. 2949				
	GCG→ GCA nt. 2985				
H153 (17-2) 24.02.2006	s.o.	s.o.	Del. C nt. 548	n.n.	resistent ID 50 > 5 µM
H238 (17-3) 27.03.2006	s.o.	s.o.	Del. C nt. 548	n.n.	resistent ID 50 > 5 µM

Patient 18

Von Patient 18 standen 2 ACV-resistente Isolate zur Verfügung. Die genotypische Untersuchung des U_L 30-Gens ergab die gleichen 10 stummen Punktmutationen, 7 Polymorphismen sowie eine resistenzassoziierte Mutation bei beiden Isolaten. Der Polymorphismus G685S ist bisher noch nicht in der Literatur erwähnt worden.

Tab. 20 Übersicht der U_L 23 und U_L 30-Mutationen der Isolate von Patient 18
Basenänderungen sind fett dargestellt. Bisher unbekannt Polymorphismen sind fett und kursiv markiert.

Patienten-ID/ Entnahmedatum	Stumme Mutation U _L 30	Polymorphismus U _L 30	Resistenzassoziierte Mutation		Phänotyp
			U _L 23	U _L 30	
H225	TAC→TAT nt. 450	AGC→GGC S33G	n.n.	AGC→AA C S724N	resistent ID 50 > 5 µM
(18-1)	GTC→GTT nt. 636	GCG→CGC A330R			
23.03.2006	CGT→CGC nt. 831	GGC→AGC G685S			
	GAC→GAT nt. 1020	GTG→ATG V905M			
	AGG→CG G nt. 2074	CCT→CAT P1124H			
	ATC→ATA nt. 2670	ACC→GCC T1208A			
	GTC→GTA nt. 2949				
	GCG→GC A nt. 2985				
H227 (18-2) 23.03.2006	s.o.	s.o.	n.n.	AGC→AA C S724N	s.o.

Abb. 11 Ausschnitt aus dem Chromatogramm der U_L 30-Sequenzierung des Isolats H225 in einem Alignment mit dem U_L 30-Genom vom Referenzstamm Strain 17, hervorgehoben ist der bisher unbekannte Polymorphismus G685S

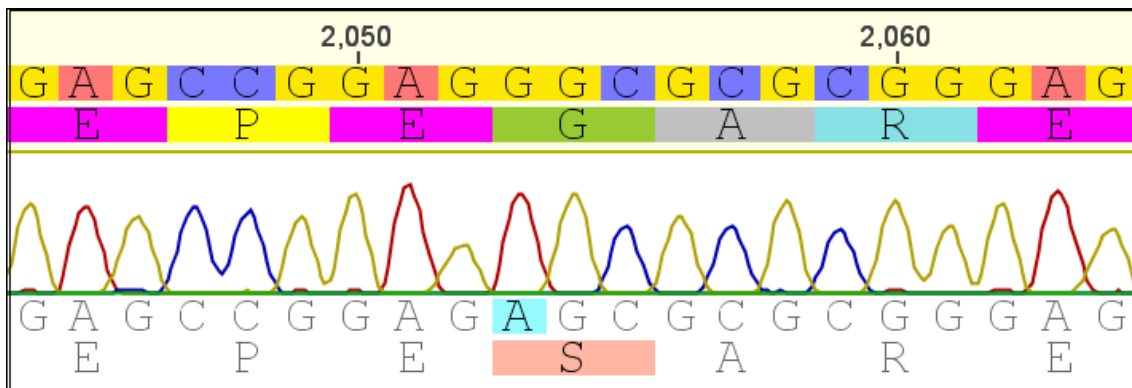
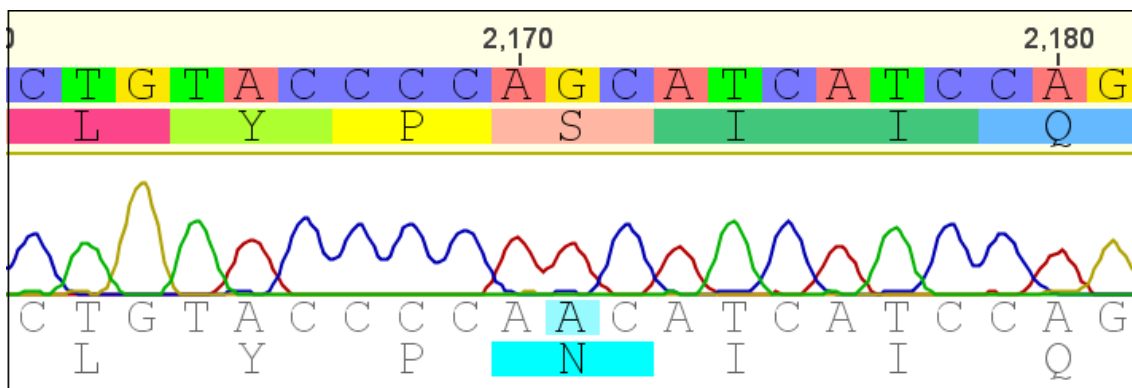


Abb. 12 Ausschnitt aus dem Chromatogramm der U_L 30-Sequenzierung des Isolats H225 in einem Alignment mit dem U_L 30-Genom vom Referenzstamm Strain 17, hervorgehoben ist die schon bekannte resistenzassoziierte Mutation S724N



KOS

In der vorliegenden Arbeit wurde der Strain 17 [67] als Referenzstamm verwendet. Ein weiterer gebräuchlicher HSV-Stamm ist KOS [110]. Er unterscheidet sich von Strain 17 durch folgende 3 Aminosäureaustausche. An Position 33 findet sich statt Serin ein Glycin (S33G), die Aminosäure 1124 ist

Prolin anstatt Histidin (P1124H) und an Stelle 1208 findet sich Threonin statt Alanin (T1208A).

3.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die folgenden Tabellen 21 und 22 fassen die genotypischen Ergebnisse für das U_L30-Gen zusammen, während Tabelle 23 nur die resistenzassoziierten Ergebnisse der resistenten Isolate zusammenfasst.

Tab.21 Zusammenfassung aller gefundenen Polymorphismen des U_L 30-Gens. Bisher unbekannte Polymorphismen sind fett markiert.

Polymorphismus	Anzahl der Isolate (in %)	Phänotypus
L267M	1 (2,4)	s
A562T	3 (7,1)	s
E682K	1 (2,4)	s
G685S	2 (4,8)	s
E1104D	3 (7,1)	s
L438M	3 (7,1)	r
S33G	39 (92,7)	s,r
A330R	42 (100)	s,r
N425T	7 (16,7)	s,r
D672N	19 (45,2)	s,r
D741N	4 (9,5)	s,r
I755F	4 (9,5)	s,r
P875S	4 (9,5)	s,r
V905M	39 (92,7)	s,r
P920S	7 (16,7)	s,r
A1099T	3 (7,1)	s,r
S1113C	3 (7,1)	s,r
T1121M	4 (9,5)	s,r
P1124H	22 (52,4)	s,r
T1208A	21 (50)	s,r

Tab.22 Zusammenfassung der gefundenen resistenz-assoziierten Mutationen des U_L 30-Gens.

Resistenzassoziierte Mutation U _L 30	Anzahl der Isolate (in %)	Phänotypus
A719V (Isolat 14-2)	1 (2,4)	r
S724N (Isolat 18-1/2)	2 (4,8)	r

Tab.23 Übersicht der ACV-resistenten Isolate mit allen zugehörigen resistenz-assoziierten genotypischen Untersuchungsergebnissen sowie der ID 50/100
Bisher unbekannte Mutationen sind fett dargestellt.

Patientenisolat	Resistenzassoziierte Mutationen U _L 23	Resistenzassoziierte Mutationen U _L 30	ID 50/100
1-2	Q104Stop	-	ID 100 = 100 µg/ml
1-3	Q104Stop	-	ID 100 > 500 µg/ml
2-2	Del. C nt. 548 (Stop a.a. 408)	-	ID 100 > 500 µM
2-4	Del. A nt. 232 (Stop a.a. 85)	-	n.b.
4-1	Add. G nt. 430 Stop a.a. 304	-	ID 100 > 500 µM
4-2	Add. G nt. 430 Stop a.a. 304	-	ID 100 > 500 µM
4-3	Add. G nt. 430 Stop a.a. 304	-	ID 100 > 500 µM
7-1	Add. G nt. 430 Stop a.a. 304	-	ID 100 > 500 µM
9-1	I78F	-	ID 100 > 500 µM
9-2	I78F W88Stop	-	ID 100 = 15 µM
9-3	I78F	-	ID 100 > 500 µM
13-2	Del. C nt. 666 Stop a.a. 408	-	ID 50 > 5 µM
13-3	Del. C nt. 666 Stop a.a. 408	-	ID 50 > 5 µM
14-2	-	A719V	ID 50 > 2,5 µM
14-4	R222H	-	ID 50 > 5 µM
272831	Add. G nt. 430 Stop a.a. 304	-	ID 50 < 5 µM
272943	Add. G nt. 430 Stop a.a. 304	-	ID 50 < 5 µM
3852-04	Add. G nt. 430 Stop a.a. 304	-	ID 50 < 5 µM
17-2	Del. C nt. 548 Stop a.a. 408	-	ID 50 > 5 µM
17-3	Del. C nt. 548 Stop a.a. 408	-	ID 50 > 5 µM
18-1	-	S724N	ID 50 > 5 µM
18-2	-	S724N	ID 50 > 5 µM

4. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war zum Einen der Gewinn neuer Erkenntnisse in Bezug auf den natürlichen Polymorphismus des Gens für die DNA-Polymerase (U_L 30) von Herpes simplex Typ 1 Virusisolaten. Zum anderen sollten die Ergebnisse in einen Kontext mit den genotypischen Untersuchungsergebnissen des Thymidinkinase-Gens (U_L 23) von Kristina Moritz [74] gebracht werden. Mutationen in diesen beiden Genen sind verantwortlich für Resistenzen von Herpesviren gegenüber Virostatika. Um die Resistenzen zu entdecken und um dementsprechend die Therapie für die Patienten anpassen zu können sind genotypische Tests, u.a. aufgrund ihrer Zeitersparnis gegenüber phänotypischen Tests, geeigneter. Für die Auswertung solcher Tests sind umfassende Kenntnisse des natürlichen Polymorphismus der beiden Gene unerlässlich. Das Ziel auf einer übergeordneten Ebene ist die Erstellung einer Online-Datenbank für HSV-1 und 2 nach dem Vorbild von „Geno2pheno“ für HIV [52] und einem Projekt einer Ulmer Forschungsgruppe für CMV [16, 54]. Diese Datenbank beinhaltet die Nukleotidsequenzen der für Resistenzen verantwortlichen Gene, sowie alle zugehörigen schon bekannten nicht-resistenzassoziierten Basensubstitutionen. Noch unbekannte Sequenzen können mit den Daten abgeglichen werden. Mithilfe dieser Datenbank können neu zu untersuchende Patientenproben im Idealfall in kürzester Zeit als sensibel oder resistent definiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die U_L 30-Gene von 42 HSV-1-Isolaten von 17 Patienten untersucht. Dafür wurde das Herpes-Virus aus Patientenproben (meist Rachenspülwasser) isoliert und aufbereitet. Anschließend wurde eine PCR mit für das U_L 30-Gen spezifischen Primern durchgeführt. Über einen weiteren Arbeitsschritt wurde mithilfe der Didesoxymethode nach Sanger (Kettenabbruchverfahren) die Nukleotidsequenz des Gens ermittelt und konnte dann analysiert werden. Die gefundenen Ergebnisse ergänzen und bestätigen die phänotypischen Ergebnisse von Elfriede Mikeler und Niklas Lensch, sowie die genotypischen Untersuchungsergebnisse des U_L 23-Gens von Kristina Moritz. In den 3 Fällen (14-2, 18-1/2), in den eine phänotypische Resistenz vorlag, aber keine resistenzassoziierte Mutation im U_L 23-Gen, konnte eine solche im U_L 30-Gen

gefunden werden. Dies bestätigt die Ergebnisse von Burrel und Sauerbrei [14, 93], die das Auftreten von resistenzassoziierten U_L 30-Mutationen ohne zusätzliche resistenzassoziierte U_L 23-Mutationen beschrieben haben.

Insgesamt wurden 37 stumme Mutationen, 20 Polymorphismen und 2 resistenzassoziierte Mutationen gefunden (siehe Tab.21). Von den 22 Polymorphismen sind 6 bisher nicht beschrieben worden. Dies sind die Polymorphismen L438M, E682K, G685S, D741N, I755F, T1121M. E682K und G685S sind jeweils nur bei sensiblen Stämmen (3-1 bzw. 18-1/2) gefunden worden, daher kann man davon ausgehen, dass sie dem natürlichen Polymorphismus zuzuordnen sind. Die unbekanntenen Polymorphismen D741N, I755F und T1121M kamen bei den 4 sequentiellen Isolaten von Patient 14 vor. Zwei Isolate dieses Patienten (14-2 und 14-4) waren ACV-resistent. Die Resistenzen wurden jedoch durch eine Mutation im U_L 23-Gen verursacht, weswegen auch D741N, I755F und T1121M dem natürlichen Polymorphismus zugeordnet werden können. Bei allen 3 ACV-resistenten Isolaten von Patient 4 kam der bisher nicht bekannte Polymorphismus L438M vor. Da auch hier die Resistenz durch eine Mutation im U_L 23-Gen zu erklären ist, ist auch L438M Polymorphismusassoziiert. Sauerbrei et al. [94] hatten 2010 den Polymorphismus D672N noch als möglicherweise resistenzverursachend beschrieben. 2011 zeigten mehrere Untersuchungen jedoch [14, 93], dass D672N bei sensiblen Stämmen vorkommt bzw. bei resistenten Stämmen, deren Resistenz anderweitig erklärt werden konnte. Diese Ergebnisse konnten mit den vorliegenden Sequenzierungen bestätigt werden. D672N kam sowohl bei sensiblen (8-1/2, 10-1, 12-1/2, 13-1, 16-1/2, 17-1) als auch bei resistenten Stämmen mit Mutation im U_L 23-Gen (4-1/2/3, 9-1/2/3, 13-2/3, 17-2/3) vor. Die Resistenzassoziierte Mutation A719V wurde bei Patient 14 im Isolat 14-2 gefunden. Dieses Isolat wurde in der phänotypischen Testung als grenzwertig sensibel bewertet. Der IC₅₀-Wert war jedoch über 8fach so hoch wie der des parallel abgenommenen Isolats 14-1 (>2,5 µM gegenüber < 0,3 µM). Das Vorhandensein der Mutation A719V spricht dafür, dass eine ACV-Resistenz vorlag, da diese Mutation bekannt dafür ist sowohl in klinischen Isolaten als auch in im Labor hergestellten HSV-1-Mutanten ACV- und Foscarnet-Resistenz

zu vermitteln [9, 14, 62]. Die FDA-Chemolumineszenztestung der Isolate 18-1 und 18-2 ergab einen IC50-Wert von $> 5 \mu\text{M}$ und damit eine fragliche ACV-Resistenz. Die Resistenz konnte durch die gefundene schon bekannte Resistenzassoziierte Mutation S724N [9, 105] bestätigt werden. Ein besonderer Fall waren die Isolate 2-1 und 2-4 von Patient 2. Isolat 2-1 wurde phänotypisch als resistent bewertet, es konnte jedoch in keinem der beiden Gene eine Resistenzassoziierte Mutation gefunden werden. Bei Isolat 2-4 war das Gegenteil der Fall. Die phänotypische Testung ergab eine ACV-Sensitivität, es wurde jedoch eine eindeutig resistenzassoziierte Mutation im U_L 23-Gen gefunden.

Die Unterschiede in der genotypischen und der phänotypischen Resistenztestung der Isolate 2-1, 2-4, 14-2 und 18-1/2 liegen vermutlich in der Störanfälligkeit der phänotypischen Testung begründet. Der PRA hat eine geringe Sensitivität für kleine Anteile an resistenten Stämmen ($<10\%$) in einer Mischpopulation. Außerdem kann es durch die anfängliche Viruspassage in Abwesenheit von Virostatika zu einem Selektionsvorteil für den Wildtypstamm kommen [11, 40]. Die phänotypischen Testungen werden jedoch zurzeit für die fraglichen Fälle wiederholt.

Einer von 20 gefundenen Polymorphismen (L438M) und eine von 2 gefundenen resistenzassoziierten Mutationen (A719V) lagen in einer der konservierten Regionen des HSV-1 Genoms (Region II bzw. IV). Die Region II ist bekannt dafür resistenzassoziierte Mutationen zu enthalten. Eine genaue Übersicht der Lokalisation der gefundenen Polymorphismen- bzw. Resistenzassoziierten Mutationen ist in Abbildung 6 dargestellt.

Diese Arbeit konnte weitere Daten in Bezug auf den natürlichen Polymorphismus des U_L 30-Gens von HSV-1 gewinnen. Es sind jedoch noch weitaus mehr Untersuchungen nötig, um eine verlässliche Datenbank zu erstellen, die im Krankenhausalltag tatsächlich genutzt werden kann.

Abb.5 Übersicht aller Isolate und der mit ihnen durchgeführten Untersuchungen. Die Ergebnisse aus den grau markierten Testungen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstellt.

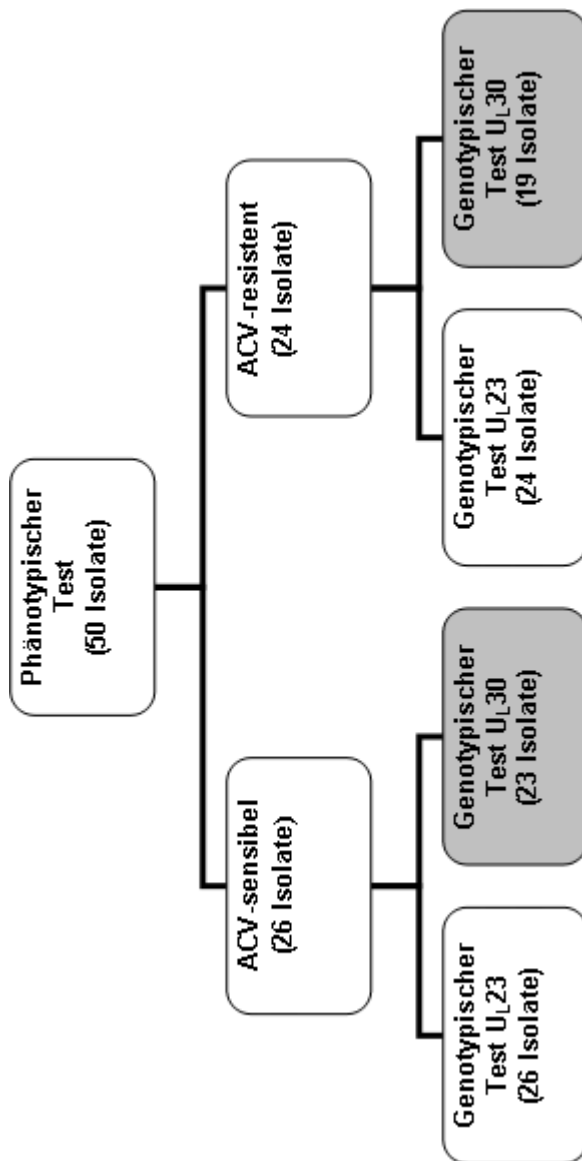
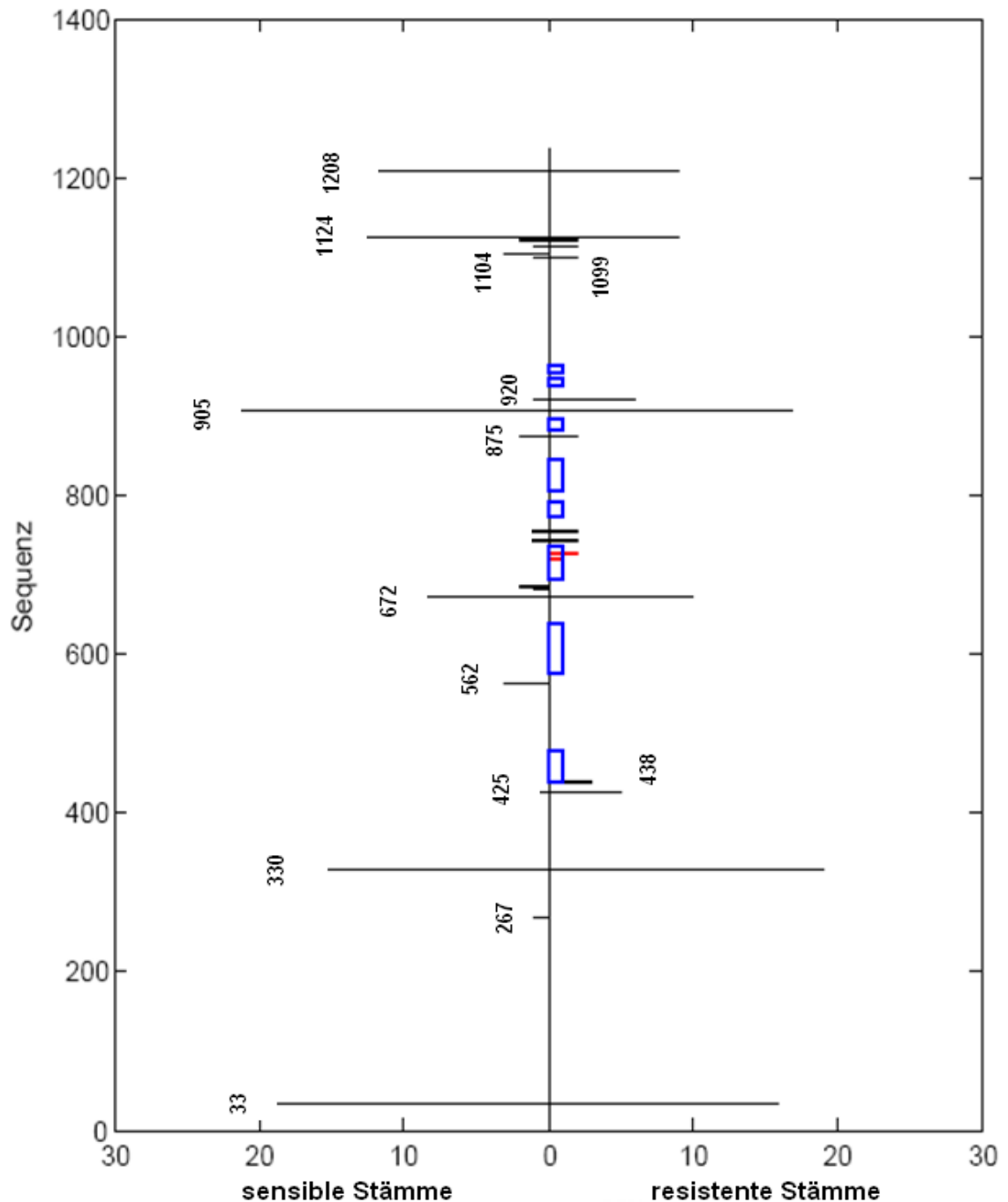


Abb.6 Übersicht aller Polymorphismen und resistenzassoziierten Mutationen des U_L 30-Gens, die in dieser Arbeit entdeckt wurden
 Auf der Abszisse ist die Aminosäureanzahl des HSV-1 Genoms aufgetragen. Die Balken auf der Ordinate zeigen den Ort und die Häufigkeit der einzelnen Mutationen und ihr Vorkommen bei sensiblen oder resistenten Stämmen. Neu entdeckte Mutationen sind fett gekennzeichnet. Mutationen, die für Resistenzen verantwortlich sind, sind rot. Die blauen Rechtecke stehen für die 8 konservierten Regionen des HSV-1-Genoms. (erstellt mithilfe der Software Matlab, The MathWorks, Inc., modifiziert in Word)



5. Zusammenfassung

Das Humane Herpes simplex Virus Typ 1 ist ein weltweit verbreitetes Virus, das in infizierten Organismen dauerhaft persistiert. In Deutschland liegt die Durchseuchungsrate bei knapp 90 % der über 40-jährigen. Die HSV-1-Infektion findet zumeist unbemerkt statt. In selteneren Fällen weisen die Patienten schmerzhafte orofaziale Schleimhautläsionen auf. Das Immunsystem von gesunden Infizierten kann die Infektion jedoch im Normalfall schnell eindämmen und die Läsionen heilen auch ohne medikamentöse Behandlung folgenlos aus. Vor allem bei Immunsupprimierten hingegen kann es zu ausgedehnten, nekrotisierenden Infektionen und zu lebensbedrohlichen Komplikationen wie HSV-Enzephalitiden oder -Pneumonien kommen. Das Mittel der Wahl zur Therapie der HSV-Infektion ist das Nukleosidanalogen Aciclovir (ACV). ACV hemmt die virale DNA-Polymerase (DNA-Pol) kompetitiv und behindert dadurch die Synthese von Virusproteinen. Um aktiviert zu werden, muss es dreimal phosphoryliert werden. Die erste Phosphorylierung erfolgt durch die virale Thymidinkinase (TK), die beiden weiteren werden von zellulären Kinasen durchgeführt. Resistenzen gegen ACV werden durch Mutationen in den beiden eben genannten Enzymen verursacht, wobei die TK für 95 % und die DNA-Pol für 5 % der Resistenzfälle verantwortlich ist. Bei Immunkompetenten stagniert die Prävalenz von Resistenzen seit der Entdeckung von Aciclovir 1974 auf einem niedrigen Niveau von etwa 0,4 %. Stammzelltransplantierte jedoch weisen Resistenzraten von bis zu 36 % auf. Um die Therapie adäquat anpassen zu können, müssen die Resistenzen schnell entdeckt werden können. Bisher ist der Goldstandard die zeitaufwendige phänotypische Testung eines Patientenisolats. Für diesen Test gibt es keine standardisierte Durchführung und Auswertung und die Interpretation ist sehr untersucherabhängig. Genotypische Tests sind weniger zeitraubend in der Durchführung und sie können objektiv interpretiert werden. Die Auswertung eines solchen Tests setzt aber voraus, dass die gefundenen Mutationen als Polymorphismus- oder Resistenzassoziiert eingeordnet werden können. Dafür sind genaue Kenntnisse des natürlichen Polymorphismus der Gene für die TK (U_L 23) und die DNA-Pol (U_L 30) vonnöten.

Das Ziel dieser Arbeit war es die Kenntnisse in Bezug auf den natürlichen Polymorphismus des U_L 30-Gens von HSV Typ 1 zu erweitern und damit genotypische Resistenztests aussagekräftiger machen zu können.

Es wurden insgesamt die U_L 30-Gene von 42 HSV-1-Isolaten von 17 Patienten untersucht. Mit einer Ausnahme handelte es sich um Patienten aus Tübingen nach Stammzelltransplantation. Bei 9 Patienten waren nur ACV-sensible Isolate vorhanden und bei 2 Patienten nur resistente Isolate. Von den restlichen 6 Patienten standen sowohl sensible als auch resistente Proben zur Verfügung.

Insgesamt wurden 37 stumme Mutationen, 20 Polymorphismen und 2 resistenzassoziierte Mutationen gefunden. Von den 20 Polymorphismen sind 6 bisher nicht beschrieben worden (L438M, E682K, G685S, D741N, I755F, T1121M, E682K und G685S).

6. Literatur

- 1. Ablashi, D.V., Chatlynne, L.G., Whitman, J.E., Jr., and Cesarman, E.,2002:**
Spectrum of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, or human herpesvirus 8, diseases. *Clinical Microbiology Reviews*. 15(3): p. 439-64.
- 2. Acyclovir-Mepha®.2007:**
Fachinformation.
- 3. Anasetti, C., Beatty, P.G., Storb, R., Martin, P.J., Mori, M., Sanders, J.E., Thomas, E.D., and Hansen, J.A.,1990:**
Effect of HLA incompatibility on graft-versus-host disease, relapse, and survival after marrow transplantation for patients with leukemia or lymphoma. *Human Immunology*. 29: p. 79-91.
- 4. Andrei, G., Snoeck, R., De Clercq, E., Esnouf, R., Fiten, P., and Opdenakker, G.,2000:**
Resistance of herpes simplex virus type 1 against different phosphonylmethoxyalkyl derivatives of purines and pyrimidines due to specific mutations in the viral DNA polymerase gene. *The Journal of General Virology*. 81: p. 639-48.
- 5. Arvin, A. and Abendroth, A., 2007:**
Comparative virion structures of human herpesviruses, in *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, A. Arvin, et al., Editors.: Cambridge.
- 6. Bacon, T.H., Levin, M.J., Leary, J.J., Sarisky, R.T., and Sutton, D.,2003:**
Herpes simplex virus resistance to acyclovir and penciclovir after two decades of antiviral therapy. *Clinical Microbiology Reviews*. 16: p. 114-28.
- 7. Balasubramaniam, N.K., Veerisetty, V., and Gentry, G.A.,1990:**
Herpesviral deoxythymidine kinases contain a site analogous to the phosphoryl-binding arginine-rich region of porcine adenylate kinase; comparison of secondary structure predictions and conservation. *The Journal of General Virology*. 71 (Pt 12): p. 2979-87.
- 8. Becker, Y., Dym, H., and Sarov, I.,1968:**
Herpes simplex virus DNA. *Virology*. 36: p. 184-92.
- 9. Bestman-Smith, J. and Boivin, G.,2003:**
Drug resistance patterns of recombinant herpes simplex virus DNA polymerase mutants generated with a set of overlapping cosmids and plasmids. *Journal of Virology*. 77: p. 7820-9.
- 10. Bleakley, M. and Riddell, S.R.,2004:**
Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nature Reviews. Cancer*. 4: p. 371-80.
- 11. Boivin, G.,1998:**
Drug-resistant herpesviruses: should we look for them? *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* : Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology. 17: p. 539-41.
- 12. Brugha, R., Keersmaekers, K., Renton, A., and Meheus, A.,1997:**
Genital herpes infection: a review. *International Journal of Epidemiology*. 26: p. 698-709.

- 13. Burns, W.H., Saral, R., Santos, G.W., Laskin, O.L., Lietman, P.S., McLaren, C., and Barry, D.W.,1982:**
Isolation and characterisation of resistant Herpes simplex virus after acyclovir therapy. *Lancet*. 1: p. 421-3.
- 14. Burrel, S., Deback, C., Agut, H., and Boutolleau, D.,2010:**
Genotypic characterization of UL23 thymidine kinase and UL30 DNA polymerase of clinical isolates of herpes simplex virus: natural polymorphism and mutations associated with resistance to antivirals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 54(11): p. 4833-42.
- 15. Champlin, R.E., Schmitz, N., Horowitz, M.M., Chapuis, B., Chopra, R., Cornelissen, J.J., Gale, R.P., Goldman, J.M., Loberiza, F.R., Jr., Hertenstein, B., Klein, J.P., Montserrat, E., Zhang, M.J., Ringden, O., Tomany, S.C., Rowlings, P.A., Van Hoef, M.E., and Gratwohl, A.,2000:**
Blood stem cells compared with bone marrow as a source of hematopoietic cells for allogeneic transplantation. IBMTR Histocompatibility and Stem Cell Sources Working Committee and the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Blood*. 95(12): p. 3702-9.
- 16. Chevillotte, M., von Einem, J., Meier, B.M., Lin, F.M., Kestler, H.A., and Mertens, T.,2010:**
A new tool linking human cytomegalovirus drug resistance mutations to resistance phenotypes. *Antiviral research*. 85(2): p. 318-27.
- 17. Christophers, J., Clayton, J., Craske, J., Ward, R., Collins, P., Trowbridge, M., and Darby, G.,1998:**
Survey of resistance of herpes simplex virus to acyclovir in northwest England. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 42(4): p. 868-72.
- 18. Coen, D.M.,1994:**
Acyclovir-resistant, pathogenic herpesviruses. *Trends in Microbiology*. 2(12): p. 481-5.
- 19. Copelan, E.A.,2006:**
Hematopoietic stem-cell transplantation. *The New England Journal of Medicine*. 354(17): p. 1813-26.
- 20. Crumpacker, C.S.,1992:**
Mechanism of action of foscarnet against viral polymerases. *The American Journal of Medicine*. 92(2A): p. 3S-7S.
- 21. Davison, A.J.,2002:**
Evolution of the herpesviruses. *Veterinary microbiology*. 86(1-2): p. 69-88.
- 22. Davison, A.J.,2010:**
Herpesvirus systematics. *Veterinary Microbiology*. 143(1): p. 52-69.
- 23. De Clercq, E.,1995:**
Trends in the Development of New Antiviral Agents for the Chemotherapy of Infections Caused by Herpesviruses and Retroviruses. *Medical Virology*. 5: p. 149-164.
- 24. De Clercq, E.,2003:**
Clinical potential of the acyclic nucleoside phosphonates cidofovir, adefovir, and tenofovir in treatment of DNA virus and retrovirus infections. *Clinical Microbiology Reviews*. 16(4): p. 569-96.
- 25. Deshmane, S.L. and Fraser, N.W.,1989:**

- During latency, herpes simplex virus type 1 DNA is associated with nucleosomes in a chromatin structure. *Journal of Virology*. 63(2): p. 943-7.
- 26. Doerr, H.W., Gehrlich, W.H., 2010:**
Medizinische Virologie, ed. G.T. Verlag. Vol. 2.
- 27. Duan, R., de Vries, R.D., Osterhaus, A.D., Remeijer, L., and Verjans, G.M., 2008:**
Acyclovir-resistant corneal HSV-1 isolates from patients with herpetic keratitis. *The Journal of Infectious Diseases*. 198(5): p. 659-63.
- 28. Earnshaw, D.L., Bacon, T.H., Darlison, S.J., Edmonds, K., Perkins, R.M., and Vere Hodge, R.A., 1992:**
Mode of antiviral action of penciclovir in MRC-5 cells infected with herpes simplex virus type 1 (HSV-1), HSV-2, and varicella-zoster virus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 36(12): p. 2747-57.
- 29. Elion, G.B., 1993:**
Acyclovir: discovery, mechanism of action, and selectivity. *Journal of Medical Virology*. Suppl 1: p. 2-6.
- 30. Elion, G.B., 1993:**
The quest for a cure. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 33: p. 1-23.
- 31. Espy, M.J., Uhl, J.R., Mitchell, P.S., Thorvilson, J.N., Svien, K.A., Wold, A.D., and Smith, T.F., 2000:**
Diagnosis of herpes simplex virus infections in the clinical laboratory by LightCycler PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 38(2): p. 795-9.
- 32. Faulds, D. and Heel, R.C., 1990:**
Ganciclovir. A review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in cytomegalovirus infections. *Drugs*. 39(4): p. 597-638.
- 33. Feldman, L.T., Ellison, A.R., Voytek, C.C., Yang, L., Krause, P., and Margolis, T.P., 2002:**
Spontaneous molecular reactivation of herpes simplex virus type 1 latency in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99(2): p. 978-83.
- 34. Field, H.J., Bell, S.E., Elion, G.B., Nash, A.A., and Wildy, P., 1979:**
Effect of acycloguanosine treatment of acute and latent herpes simplex infections in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 15(4): p. 554-61.
- 35. Furlong, D., Swift, H., and Roizman, B., 1972:**
Arrangement of herpesvirus deoxyribonucleic acid in the core. *Journal of Virology*. 10(5): p. 1071-4.
- 36. Garber, D.A., Schaffer, P.A., and Knipe, D.M., 1997:**
A LAT-associated function reduces productive-cycle gene expression during acute infection of murine sensory neurons with herpes simplex virus type 1. *Journal of Virology*. 71(8): p. 5885-93.
- 37. Garfinkle, B. and McAuslan, B.R., 1974:**
Regulation of herpes simplex virus-induced thymidine kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 58(3): p. 822-9.
- 38. Gaudreau, A., Hill, E., Balfour, H.H., Jr., Erice, A., and Boivin, G., 1998:**
Phenotypic and genotypic characterization of acyclovir-resistant herpes simplex viruses from immunocompromised patients. *The Journal of Infectious Diseases*. 178(2): p. 297-303.

- 39. Gilbert, C., Bestman-Smith, J., and Boivin, G.,2002:**
Resistance of herpesviruses to antiviral drugs: clinical impacts and molecular mechanisms. *Drug Resistance Updates : Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*. 5(2): p. 88-114.
- 40. Gilbert, C., Handfield, J., Toma, E., Lalonde, R., Bergeron, M.G., and Boivin, G.,1998:**
Emergence and prevalence of cytomegalovirus UL97 mutations associated with ganciclovir resistance in AIDS patients. *AIDS*. 12(2): p. 125-9.
- 41. Graham, D., Larder, B.A., and Inglis, M.M.,1986:**
Evidence that the 'active centre' of the herpes simplex virus thymidine kinase involves an interaction between three distinct regions of the polypeptide. *The Journal of General Virology*. 67 (Pt 4): p. 753-8.
- 42. Grunewald, K., Desai, P., Winkler, D.C., Heymann, J.B., Belnap, D.M., Baumeister, W., and Steven, A.C.,2003:**
Three-dimensional structure of herpes simplex virus from cryo-electron tomography. *Science*. 302(5649): p. 1396-8.
- 43. Hayward, G.S., Jacob, R.J., Wadsworth, S.C., and Roizman, B.,1975:**
Anatomy of herpes simplex virus DNA: evidence for four populations of molecules that differ in the relative orientations of their long and short components. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 72(11): p. 4243-7.
- 44. Heine, J.W., Spear, P.G., and Roizman, B.,1972:**
Proteins specified by herpes simplex virus. VI. Viral proteins in the plasma membrane. *Journal of Virology*. 9(3): p. 431-9.
- 45. Herrman, E.C., Jr.,1961:**
Plaque inhibition test for detection of specific inhibitors of DNA containing viruses. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. Society for Experimental Biology and Medicine. 107: p. 142-5.
- 46. Honess, R.W. and Roizman, B.,1974:**
Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *Journal of Virology*. 14(1): p. 8-19.
- 47. Hopps, H.E., Bernheim, B.C., Nisalak, A., Tjio, J.H., and Smadel, J.E.,1963:**
Biologic Characteristics of a Continuous Kidney Cell Line Derived from the African Green Monkey. *Journal of Immunology*. 91: p. 416-24.
- 48. Horowitz, M.M., Gale, R.P., Sondel, P.M., Goldman, J.M., Kersey, J., Kolb, H.J., Rimm, A.A., Ringden, O., Rozman, C., Speck, B., and et al.,1990:**
Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood*. 75(3): p. 555-62.
- 49. Huff, J.L. and Barry, P.A.,2003:**
B-virus (Cercopithecine herpesvirus 1) infection in humans and macaques: potential for zoonotic disease. *Emerging Infectious Diseases*. 9(2): p. 246-50.
- 50. Hwang, C.B., Horsburgh, B., Pelosi, E., Roberts, S., Digard, P., and Coen, D.M.,1994:**

A net +1 frameshift permits synthesis of thymidine kinase from a drug-resistant herpes simplex virus mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91(12): p. 5461-5.

51. Hwang, C.B., Ruffner, K.L., and Coen, D.M.,1992:

A point mutation within a distinct conserved region of the herpes simplex virus DNA polymerase gene confers drug resistance. *Journal of Virology*. 66(3): p. 1774-6.

52. Informatik, M.-P.-I.2013:

<http://www.geno2pheno.org/>. [cited 2013 08.05.2013].

53. Karow, T., Lang-Roth, R., 2010:

Pharmakologie und Toxikologie. Vol. 18.

54. Kestler, H.A.2010:

<http://www.informatik.uni-ulm.de/ni/mitarbeiter/HKestler/hcmv/index.html>. [cited 2012 31.05.2012].

55. Kleymann, G.,2003:

Novel agents and strategies to treat herpes simplex virus infections. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 12(2): p. 165-83.

56. Kost, R.G., Hill, E.L., Tigges, M., and Straus, S.E.,1993:

Brief report: recurrent acyclovir-resistant genital herpes in an immunocompetent patient. *The New England Journal of Medicine*. 329(24): p. 1777-82.

57. Kriesel, J.D., Spruance, S.L., Prichard, M., Parker, J.N., and Kern, E.R.,2005:

Recurrent antiviral-resistant genital herpes in an immunocompetent patient. *The Journal of Infectious Diseases*. 192(1): p. 156-61.

58. Kudo, E., Shiota, H., Naito, T., Satake, K., and Itakura, M.,1998:

Polymorphisms of thymidine kinase gene in herpes simplex virus type 1: analysis of clinical isolates from herpetic keratitis patients and laboratory strains. *Journal of Medical Virology*. 56(2): p. 151-8.

59. Langston, A.A., Redei, I., Caliendo, A.M., Somani, J., Hutcherson, D., Lonial, S., Bucur, S., Cherry, J., Allen, A., and Waller, E.K.,2002:

Development of drug-resistant herpes simplex virus infection after haploidentical hematopoietic progenitor cell transplantation. *Blood*. 99(3): p. 1085-8.

60. Larder, B.A., Cheng, Y.C., and Darby, G.,1983:

Characterization of abnormal thymidine kinases induced by drug-resistant strains of herpes simplex virus type 1. *The Journal of General Virology*. 64 Pt 3: p. 523-32.

61. Larder, B.A. and Darby, G.,1984:

Virus drug-resistance: mechanisms and consequences. *Antiviral Research*. 4(1-2): p. 1-42.

62. Larder, B.A., Kemp, S.D., and Darby, G.,1987:

Related functional domains in virus DNA polymerases. *The EMBO Journal*. 6(1): p. 169-75.

63. Lehman, I.R. and Boehmer, P.E.,1999:

Replication of herpes simplex virus DNA. *Journal of Biological Chemistry*. 274(40): p. 28059-62.

64. Lensch, N.,2006:

Phänotypische und genotypische Charakterisierung der Virostatika-Suszeptibilität von Herpes simplex Virusisolaten nach Stammzelltransplantation. Zahnmedizinische Dissertation, Universität Tübingen.

65. Little, S.P., Jofre, J.T., Courtney, R.J., and Schaffer, P.A.,1981:

A virion-associated glycoprotein essential for infectivity of herpes simplex virus type 1. *Virology*. 115(1): p. 149-60.

66. Lycke, E., Kristensson, K., Svennerholm, B., Vahlne, A., and Ziegler, R.,1984:

Uptake and transport of herpes simplex virus in neurites of rat dorsal root ganglia cells in culture. *The Journal of General Virology*. 65 (Pt 1): p. 55-64.

67. McGeoch, D.J., Dalrymple, M.A., Davison, A.J., Dolan, A., Frame, M.C., McNab, D., Perry, L.J., Scott, J.E., and Taylor, P.,1988:

The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *The Journal of General Virology*. 69 (Pt 7): p. 1531-74.

68. Mellerick, D.M. and Fraser, N.W.,1987:

Physical state of the latent herpes simplex virus genome in a mouse model system: evidence suggesting an episomal state. *Virology*. 158(2): p. 265-75.

69. Meyers, J.D., Flournoy, N., and Thomas, E.D.,1980:

Infection with herpes simplex virus and cell-mediated immunity after marrow transplant. *The Journal of Infectious Diseases*. 142(3): p. 338-46.

70. Modrow, S., Falke, D., Truyen, U., 2003:

Herpesviren, in *Molekulare Virologie*, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg/Berlin. p. 541-613.

71. Morfin, F., Bilger, K., Boucher, A., Thiebaut, A., Najioullah, F., Bleyzac, N., Raus, N., Bosshard, S., Aymard, M., Michallet, M., and Thouvenot, D.,2004:

HSV excretion after bone marrow transplantation: a 4-year survey. *Journal of Clinical Virology : The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 30(4): p. 341-5.

72. Morfin, F. and Thouvenot, D.,2003:

Herpes simplex virus resistance to antiviral drugs. *Journal of Clinical Virology : The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 26(1): p. 29-37.

73. Morgan, C., Rose, H.M., and Mednis, B.,1968:

Electron microscopy of herpes simplex virus. I. Entry. *Journal of Virology*. 2(5): p. 507-16.

74. Moritz, K.,2010:

Mutationsanalyse des Herpes Simplex Virus Thymidinkinasegens (U_L 23) von Patienten nach Stammzelltransplantation im Kontext von Aciclovir-Resistenz und Polymorphismus. Medizinische Dissertation, Universität Tübingen.

75. Nahmias, A.J., Lee, F.K., and Beckman-Nahmias, S.,1990:

Sero-epidemiological and -sociological patterns of herpes simplex virus infection in the world. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases. Supplementum*. 69: p. 19-36.

76. Newcomb, W.W. and Brown, J.C.,1991:

Structure of the herpes simplex virus capsid: effects of extraction with guanidine hydrochloride and partial reconstitution of extracted capsids. *Journal of Virology*. 65(2): p. 613-20.

- 77. Ojala, P.M., Sodeik, B., Ebersold, M.W., Kutay, U., and Helenius, A., 2000:**
Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro. *Molecular and Cellular Biology*. 20(13): p. 4922-31.
- 78. Padgett, D.A., Sheridan, J.F., Dorne, J., Berntson, G.G., Candelora, J., and Glaser, R., 1998:**
Social stress and the reactivation of latent herpes simplex virus type 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95(12): p. 7231-5.
- 79. Perng, G.C., Dunkel, E.C., Geary, P.A., Slanina, S.M., Ghiasi, H., Kaiwar, R., Nesburn, A.B., and Wechsler, S.L., 1994:**
The latency-associated transcript gene of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is required for efficient in vivo spontaneous reactivation of HSV-1 from latency. *Journal of Virology*. 68(12): p. 8045-55.
- 80. Perng, G.C., Jones, C., Ciacci-Zanella, J., Stone, M., Henderson, G., Yukht, A., Slanina, S.M., Hofman, F.M., Ghiasi, H., Nesburn, A.B., and Wechsler, S.L., 2000:**
Virus-induced neuronal apoptosis blocked by the herpes simplex virus latency-associated transcript. *Science*. 287(5457): p. 1500-3.
- 81. Piret, J. and Boivin, G., 2011:**
Resistance of herpes simplex viruses to nucleoside analogues: mechanisms, prevalence, and management. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 55(2): p. 459-72.
- 82. Poffenberger, K.L. and Roizman, B., 1985:**
A noninverting genome of a viable herpes simplex virus 1: presence of head-to-tail linkages in packaged genomes and requirements for circularization after infection. *Journal of Virology*. 53(2): p. 587-95.
- 83. Pottage, J.C., Jr. and Kessler, H.A., 1995:**
Herpes simplex virus resistance to acyclovir: clinical relevance. *Infectious Agents and Disease*. 4(3): p. 115-24.
- 84. Roizman, B., 1979:**
The structure and isomerization of herpes simplex virus genomes. *Cell*. 16(3): p. 481-94.
- 85. Roizman, B., Furlong, D., 1974:**
Comprehensive Virology in The Replication of Herpesviruses, H. Fraenkel-Conrat, Wagner, R.R., Editor, Plenum Press: New York. p. 229-404.
- 86. Roizman, B., Knipe, D.M., Whitley, R.J., 2007:**
Herpes simplex Viruses, in *Fields Virology*, D.M. Knipe, Howley, P.M., Editor, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia. p. 2501-2601.
- 87. Roizman, B. and Sears, A.E., 1987:**
An inquiry into the mechanisms of herpes simplex virus latency. *Annual Review of Microbiology*. 41: p. 543-71.
- 88. Roizman, B., Sears, AE, 2001:**
Herpes simplex Viruses and their replication, in *Fields Virology*, B. Fields, Knipe, DM, Howley PM, Editor, Lippincott William & Wilkins: Philadelphia. p. 2399-2459.

89. Roizmann, B., Desrosiers, R.C., Fleckenstein, B., Lopez, C., Minson, A.C., and Studdert, M.J.,1992:

The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Archives of Virology. 123(3-4): p. 425-49.

90. Romee, R., Brunstein, C.G., Weisdorf, D.J., and Majhail, N.S.,2010:

Herpes simplex virus encephalitis after allogeneic transplantation: an instructive case. Bone Marrow Transplantation. 45(4): p. 776-8.

91. Sandherr, M., Einsele, H., Hebart, H., Kahl, C., Kern, W., Kiehl, M., Massenkeil, G., Penack, O., Schiel, X., Schuettrumpf, S., Ullmann, A.J., and Cornely, O.A.,2006:

Antiviral prophylaxis in patients with haematological malignancies and solid tumours: Guidelines of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society for Hematology and Oncology (DGHO). Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO. 17(7): p. 1051-9.

92. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R.,1977:

DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 74(12): p. 5463-7.

93. Sauerbrei, A., Bohn, K., Heim, A., Hofmann, J., Weissbrich, B., Schnitzler, P., Hoffmann, D., Zell, R., Jahn, G., Wutzler, P., and Hamprecht, K.,2011:

Novel resistance-associated mutations of thymidine kinase and DNA polymerase genes of herpes simplex virus type 1 and type 2. Antiviral Therapy. 16(8): p. 1297-308.

94. Sauerbrei, A., Deinhardt, S., Zell, R., and Wutzler, P.,2010:

Phenotypic and genotypic characterization of acyclovir-resistant clinical isolates of herpes simplex virus. Antiviral Research. 86(3): p. 246-52.

95. Skepper, J.N., Whiteley, A., Browne, H., and Minson, A.,2001:

Herpes simplex virus nucleocapsids mature to progeny virions by an envelopment --> deenvelopment --> reenvelopment pathway. Journal of Virology. 75(12): p. 5697-702.

96. Smiley, J.R.,2004:

Herpes simplex virus virion host shutoff protein: immune evasion mediated by a viral RNase? Journal of Virology. 78(3): p. 1063-8.

97. Smith, J.S. and Robinson, N.J.,2002:

Age-specific prevalence of infection with herpes simplex virus types 2 and 1: a global review. The Journal of Infectious Diseases. 186 Suppl 1: p. S3-28.

98. Soul-Lawton, J., Seaber, E., On, N., Wootton, R., Rolan, P., and Posner, J.,1995:

Absolute bioavailability and metabolic disposition of valaciclovir, the L-valyl ester of acyclovir, following oral administration to humans. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 39(12): p. 2759-64.

99. Spruance, S.L.,1985:

Pathogenesis of herpes simplex labialis: experimental induction of lesions with UV light. Journal of Clinical Microbiology. 22(3): p. 366-8.

100. Stackpole, C.W.,1969:

Herpes-type virus of the frog renal adenocarcinoma. I. Virus development in tumor transplants maintained at low temperature. *Journal of Virology*. 4(1): p. 75-93.

101. Steiner, I.,2011:

Herpes simplex virus encephalitis: new infection or reactivation? *Current Opinion in Neurology*. 24(3): p. 268-74.

102. Steiner, I. and Kennedy, P.G.,1991:

Herpes simplex virus latency in the nervous system--a new model. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 17(6): p. 433-40.

103. Stevens, J.G.,1989:

Human herpesviruses: a consideration of the latent state. *Microbiological Reviews*. 53(3): p. 318-32.

104. Stranska, R., Schuurman, R., Scholl, D.R., Jollick, J.A., Shaw, C.J., Loef, C., Polman, M., and van Loon, A.M.,2004:

ELVIRA HSV, a yield reduction assay for rapid herpes simplex virus susceptibility testing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48(6): p. 2331-3.

105. Stranska, R., van Loon, A.M., Bredius, R.G., Polman, M., Nienhuis, E., Beersma, M.F., Lankester, A.C., and Schuurman, R.,2004:

Sequential switching of DNA polymerase and thymidine kinase-mediated HSV-1 drug resistance in an immunocompromised child. *Antiviral Therapy*. 9(1): p. 97-104.

106. Stranska, R., van Loon, A.M., Polman, M., Beersma, M.F., Bredius, R.G., Lankester, A.C., Meijer, E., and Schuurman, R.,2004:

Genotypic and phenotypic characterization of acyclovir-resistant herpes simplex viruses isolated from haematopoietic stem cell transplant recipients. *Antiviral Therapy*. 9(4): p. 565-75.

107. Thomas, E.D., Lochte, H.L., Jr., Cannon, J.H., Sahler, O.D., and Ferrebee, J.W.,1959:

Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *The Journal of Clinical Investigation*. 38: p. 1709-16.

108. Underwood, G.E. and Weed, S.D.,1974:

Recurrent cutaneous herpes simplex in hairless mice. *Infection and Immunity*. 10(3): p. 471-4.

109. Vere Hodge, R.A., Sutton, D., Boyd, M.R., Harnden, M.R., and Jarvest, R.L.,1989:

Selection of an oral prodrug (BRL 42810; famciclovir) for the antiherpesvirus agent BRL 39123 [9-(4-hydroxy-3-hydroxymethylbut-1-yl)guanine; penciclovir]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 33(10): p. 1765-73.

110. Werdin, F., Rennekampff, H.O., Schaller, H.E., Jahn, G., and Hamprecht, K.,2008:

Thymidine kinase sequence analysis of herpes simplex virus type 1 strains present in different compartments in an atypical impetiginous rash on the lesional skin of a burn patient. *Journal of clinical microbiology*. 46(9): p. 3162-4.

111. Whitley, R.J. and Roizman, B.,2001:

Herpes simplex virus infections. *Lancet*. 357(9267): p. 1513-8.

112. Wildy, P., Russell, W.C., and Horne, R.W.,1960:

The morphology of herpes virus. *Virology*. 12: p. 204-22.

- 113. Wong, S.W., Wahl, A.F., Yuan, P.M., Arai, N., Pearson, B.E., Arai, K., Korn, D., Hunkapiller, M.W., and Wang, T.S.,1988:**
Human DNA polymerase alpha gene expression is cell proliferation dependent and its primary structure is similar to both prokaryotic and eukaryotic replicative DNA polymerases. *The EMBO Journal*. 7(1): p. 37-47.
- 114. Wood, M.J.,1998:**
Viral infections in neutropenia--current problems and chemotherapeutic control. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 41 Suppl D: p. 81-93.
- 115. WuDunn, D. and Spear, P.G.,1989:**
Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. *Journal of Virology*. 63(1): p. 52-8.
- 116. Wutzler, P., Doerr, H.W., Farber, I., Eichhorn, U., Helbig, B., Sauerbrei, A., Brandstadt, A., and Rabenau, H.F.,2000:**
Seroprevalence of herpes simplex virus type 1 and type 2 in selected German populations-relevance for the incidence of genital herpes. *Journal of Medical Virology*. 61(2): p. 201-7.

8. Anhang

Danksagung

Ich möchte Herrn Professor Jahn für die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten im Institut für Medizinische Virologie Tübingen danken.

Ebenso danke ich Herrn Professor Hamprecht für die Überlassung des Dissertationsthemas und die Betreuung der vorliegenden Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei dem gesamten Laborteam um Herrn Professor Sauerbrei im Institut für Virologie und Antivirale Therapie in Jena bedanken für die hilfreiche Unterstützung bei der praktischen Labortätigkeit und die ausgesprochen nette Atmosphäre.

Ganz besonders möchte ich mich bei Elfriede Mikeler bedanken, die mich die gesamte Zeit über betreute und mir das Arbeiten im Labor beibrachte.