

Aus dem Institut für
Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten
der Universität Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. G. Jahn

**Phänotypische und genotypische Charakterisierung
der Virostatika-Suszeptibilität von Herpes Simplex
Virusisolaten nach Stammzelltransplantation**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Börries Niklas Lensch
aus
Filderstadt

2006

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. Dr. K. Hamprecht
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. W. Vogel

Vorwort

Besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. G. Jahn, welcher mir, durch die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten, die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht hat.

Herrn PD Dr. Dr. K. Hamprecht, der als Leiter der Arbeitsgruppe viele Anregungen und Ratschläge geben konnte, bin ich auch zu großem Dank verpflichtet.

Herrn PD Dr. G. Kleymann darf ich für viele wertvolle Anregungen, sowie für die gute Zusammenarbeit danken.

Danken möchte ich auch besonders Frau Mikeler, die mit ihrer Erfahrung immer eine Hilfe bei der praktischen Laborarbeit war.

Abkürzungen

ACV	Aciclovir
ACVres	Aciclovir-resistent
ACVsens	Aciclovir-sensitiv
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
AS	Aminosäure
BAL	Bronchiallavage
bp	Basenpaar
CDV	Cidofovir
CML	Chronische myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalovirus
CPE	Zytopathischer Effekt
CRA	CPE-Reduktionstest (CPE-Reduction Assay)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein Barr Virus
FCS	Fetales Kälberserum
FCV	Famciclovir
GCV	Ganciclovir
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HSV	Herpes Simplex Virus
IC ₅₀ / ID ₅₀	Inhibitorische Dosis 50%
Kb	Kilobasen
KMT	Knochenmarktransplantation
LD ₅₀	Letale Dosis 50%
MEM	Minimum essential medium
n.u.	Nicht untersucht
nt	Nukleotid
PBSZT	Periphere Blutstammzelltransplantation
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PCV	Penciclovir
PFA	Foscarnet
PFU	Plaque Forming Unit
PRA	Plaquereduktionstest (Plaque Reduction Assay)
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SZT	Stammzelltransplantation
TCID ₅₀	Tissue culture infectious dose 50%
TK	Thymidinkinase
VACV	Valaciclovir
Vhs	Virion Host Shut-off Protein
VZV	Varizella Zoster Virus
Z.n.	Zustand nach
Z.v.	Zustand vor

1	Einleitung	8
1.1.1	Historischer Überblick	8
1.1.2	Molekulare Struktur von HSV	9
1.1.3	Replikationszyklus	10
1.2	Epidemiologie	11
1.3	Klinische Manifestation von HSV	12
1.3.1	HSV und Stammzelltransplantation	13
1.4	Antivirale Therapie von HSV	13
1.4.1	Entwicklung antiviraler Substanzen	13
1.4.2	Aciclovir (ACV)	15
1.4.3	Valaciclovir (VACV)	17
1.4.4	Penciclovir (PCV)	17
1.4.5	Famciclovir (FCV)	18
1.4.6	Brivudin (BVDU)	18
1.4.7	Foscarnet (PFA)	18
1.4.8	Cidofovir (CDV)	20
1.4.9	Breites Wirkungsspektrum „HSV-spezifischer“ Virostatika	22
1.5	Resistenzmechanismen bei HSV	22
1.5.1	Mutationen innerhalb von UL 23	23
1.5.2	Mutationen innerhalb von UL 30	25
1.6	Resistenzen – Inzidenz und Prävalenz	25
1.7	Methoden zum Nachweis einer Resistenz	26
1.7.1	Phänotypischer Test	26
1.7.2	Schwellenwerte für Resistenz	27
1.7.3	Genotypischer Test	29
1.8	Zielsetzung dieser Arbeit	30
2	Material	32
2.1.1	Humane Vorhautfibroblasten	32
2.1.2	Vero-Zellen - African green monkey kidney cells	32
2.1.3	Herpes Simplex Viren	32
2.2	Lösungen und Kulturmedien für die Zellkultur und die phänotypische Testung	32
2.3	Lösungen für die HSV-gB-Immunperoxidasefärbung	33
2.4	Lösungen für den A/S-Test	34
2.5	Virostatika	34
2.6	Lösungen für die DNS-Isolierung	35
2.7	Lösungen für die PCR	35
2.8	Lösungen für die Gelelektrophorese	35
2.9	Lösungen für den Immunfluoreszenztest	36
2.10	Lösungen für die DNS Reinigung und Sequenzierung	36
2.11	Geräte	37
2.12	Software	37
3	Methoden	38
3.1	Zellkultur	38
3.1.1	HFF und Vero-Zellen	38
3.2	HSV-Patientenisolate	39
3.2.1	Gewinnung eines HSV-Lysates	40
3.3	Phänotypischer Test	40

3.3.1	Zellzählung	40
3.3.2	Bestimmung der Viruskonzentration	41
3.3.2.1	Die Endpunktmethode - Tissue Culture Infectious Dose 50% (TCID ₅₀)	41
3.3.2.2	Bestimmung des Plaque-Titers - Plaque Forming Units (PFU)	43
3.3.2.3	Schätzung des Plaquetiters mit dem Screening-Plaquereduktionstest	44
3.3.2.4	Anzahl Viruspartikel im Verhältnis zur Zellzahl - Multiplicity of Infection (m.o.i.)	44
3.3.3	Qualitativ-phänotypischer Test zur Bestimmung der 100%igen inhibitorischen Konzentration – CPE-Reduktionstest (CRA)	45
3.3.4	Screening-Plaquereduktionstest (SPRA)	46
3.3.5	Plaquereduktionstest (PRA) zur Bestimmung der 50%igen inhibitorischen Konzentration - IC ₅₀ Bestimmung mittels Probit-Analyse	48
3.3.6	Aktivitäts- und Selektivitätstest	50
3.4	Generierung von Labormutanten	52
3.4.1	Selektionierung mittels steigender Virostatika-Konzentration – ACV-Selektion	52
3.4.2	Generierung einer PFA-resistenten Mutante – PFA-Selektion	53
3.5	Genotypische Untersuchungen	54
3.5.1	Immunfluoreszenztest (IFT) zum Nachweis und zur Typisierung von HSV 1 und HSV 2	54
3.5.2	Sequenzierung von UL23	54
4	Ergebnisse	58
4.1	CPE Reduktionstest	58
4.2	Histochemische und HSV-spezifische Plauefärbung	60
4.3	Screening-Plaquereduktionstest (SPRA)	65
4.4	Plaquereduktionstest (PRA)	67
4.4.1	Virostatika-Suszeptibilität Referenzstamm und Patientenisolate	68
4.4.2	Virostatika-Suszeptibilität der generierten ACV-resistenten Laborstämme	69
4.4.3	Virostatika-Suszeptibilität des PFA-resistenten Laborstammes	70
4.5	Aktivitäts- und Selektivitätstest (A/S-Test)	71
4.6	Untersuchung antiviraler Wirksamkeit mit dem Aktivitäts- und Selektivitätstest	76
4.6.1	Wirkung neuer antiviraler Substanzen In vitro	76
4.6.2	Amphiphiles Nucleosid-Phosphono-Ameisensäurederivat (N3)	76
4.6.3	BAY 57-1293	79
4.7	Genotypische Untersuchungen	80
4.7.1	Typisierung	80
4.7.2	UL23 PCR	80
4.8	Sequenzierung	81
5	Diskussion	85
5.1	Phänotypische Resistenzuntersuchungen	85
5.1.1	Schwellenwerte für Resistenz	85
5.1.2	Phänotypische Testung: Einfluß der Vortitration	86

5.1.3	Vergleich von vier phänotypischen Testmethoden	87
5.1.4	Phänotypische Charakterisierung generierter Labormutanten	90
5.1.5	Wirkung von N3 und Bay 12-5793 auf die HSV-Replikation	90
5.2	Untersuchung von HSV UL 23	91
6	Zusammenfassung	92
7	Literatur	92
8	Anhang	100

1 Einleitung

1.1.1 Historischer Überblick

„O`er ladies lips, who straight on kisses dream, which oft the angry Mab with blisters plagues, because their breaths with sweetmeats tainted are.“ (Shakespeare, Romeo und Julia I, 4.)

Recht eindeutige Beschreibungen von Fieberbläschen finden sich nicht erst bei Shakespeare, sondern auch schon bei Hippocrates. Die ersten Viren die genauer untersucht wurden, waren die Bakterien befallenden Bakteriophagen, welche leicht in Bakterienkulturen gezüchtet werden können. Für humanpathogene Viren verwendete man lange Zeit den Brutei- oder Tierversuch. Enders et al. entdeckten 1949, dass man Viren in Zellkultur züchten kann und diese mikroskopisch durch das Auftreten von spezifischen zelldegenerativen Effekten, sogenannten zytopathischen Effekten (CPEs), nachzuweisen sind (Enders et al., 1949). Die Basismethode für die moderne Virologie war damit geschaffen. Das erste Bild eines Herpes Simplex Virus wurde 1953 mit einem Elektronenmikroskop gemacht. Die Entdeckung der Fähigkeit, in der Gegenwart von Antikörpern, ohne erneute exogene Infektion, einen neuen infektiösen Prozess hervorzurufen, führte zur Unterteilung in primäre und rezidivierende Herpes Simplex Virus (HSV) Infektion. 1968 wurde von Nahmias und Dowdle der genetische Unterschied zwischen HSV Typ 1 und Typ 2 und die Eigenschaft, dass Typ 1 meistens oro-faciale und Typ 2 meistens genitale Infektionen hervorruft nachgewiesen. Die Eigenschaft der Latenz (kennzeichnend für alle Herpesviren), die moderne Transplantationsmedizin und das HI-Virus lassen der ansonsten meist harmlosen HSV-Infektion, abgesehen von der Herpes-Enzephalitis und Herpes-Neonatorum, eine bedeutende Rolle als Pathogen zuteil werden.

1.1.2 Molekulare Struktur von HSV

Das HSV Genom umfasst 152kb, unterteilt in ein langes Segment mit 126kb (U_L , unique long) und ein kurzes Segment mit 26kb (U_S , unique short). Diese Segmente sind von wiederholenden Sequenzen begrenzt (Abbildung 1). Es gibt vier mögliche Isomere. Die doppelsträngige DNS befindet sich im Kapsid um einen Proteinkern. Das Kapsid ist aus 162 Kapsomeren aufgebaut. Um das Kapsid herum befindet sich das Tegument, welches verschiedene regulierende Proteine enthält. In die Hüllmembran, die aus der inneren Kernmembran stammt, sind elf verschiedene Glycoproteine eingelagert. In Abbildung 2 ist oben rechts ein intaktes Virus mit Hülle (hell), Tegument (dunkel), Kapsid (hell) und Kern (dunkel) zu sehen. Links ist ein Kapsid ohne Hülle zu sehen und rechts unten ein Virus mit vergrößerter Hülle.

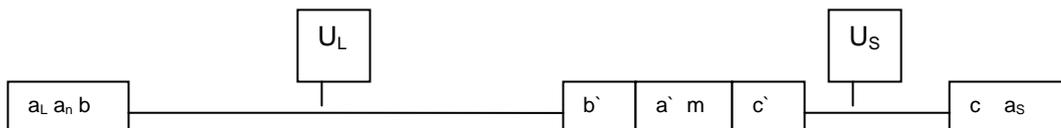


Abbildung 1: Das Genom ist durch Wiederholungssequenzen in zwei Abschnitte unterteilt. Das lange Segment und das kurze Segment sind von a_L : terminale a Sequenz, a_n : variable Anzahl weiterer a Sequenzen, b Sequenz, $b`$ einer Wiederholung der b Sequenz, einer variablen Anzahl von a Sequenzen a_m , der $c`$ und der c Sequenz sowie von der a_s Sequenz begrenzt (Nach Roizman, 2001).

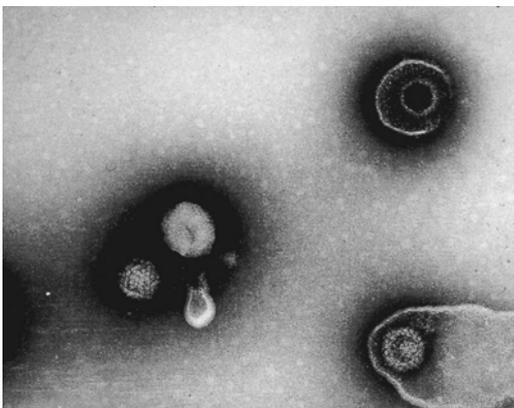


Abbildung 2: EM-Aufnahme von negativ gefärbten HSV-Partikeln (Roizman, 2001).

1.1.3 Replikationszyklus

HSV bindet mit dem gC Protein an Heparansulfat auf der Zellmembran, wo die Hülle mit der Membran verschmilzt. Das Kapsid wird an Mikrotubuli zum Kern transportiert und die Tegument Proteine werden freigesetzt (Abbildung 3, 1, Seite 11). Das vhs Protein baut die mRNS des Wirts ab. Im Kern zirkularisiert das Genom (Abbildung 3, 2, Seite 11). Durch die Bindung von α -TIF (alpha-Trans Inducing Factor, VP16) an die Promotoren der sehr frühen Gene, werden diese Proteine zuerst von der RNS Polymerase II des Wirts transkribiert (α -RNS). Die sehr frühen (immediate early) Proteine aktivieren wiederum die Promotoren der frühen Gene, deren Produkte der Replikation dienen (z.B. Thymidinkinase U_L23, Polymerase U_L30+U_L42, Helicase-Primase-Komplex U_L5,U_L8,U_L52, Ribonukleotidreductase U_L39+U_L40). Die Replikation kann an drei Stellen beginnen und wird als rolling-circle Mechanismus bezeichnet (Abbildung 3, 3, Seite 11). Die aus vielen einzelnen Genomen bestehende DNS wird geschnitten und in die Kapside gepackt (Abbildung 3, 4, Seite 11). Um das Kapsid ordnen sich die Tegumentproteine, die mit der inneren Kernmembran interagieren, wo die virusspezifischen Glycoproteine eingelagert sind und aus welcher die Hülle hervorgeht. Die meisten späten Genprodukte sind Struktur- und Glykoproteine. Deren Transkription und Translation verläuft parallel zur Replikation. Während der Latenz konnte man bisher keine Proteine nachweisen. Aus den Wiederholungssequenzen wird während der Latenz eine RNS transkribiert, welche als Antisensestrang für ein immediate-early Gen fungiert.

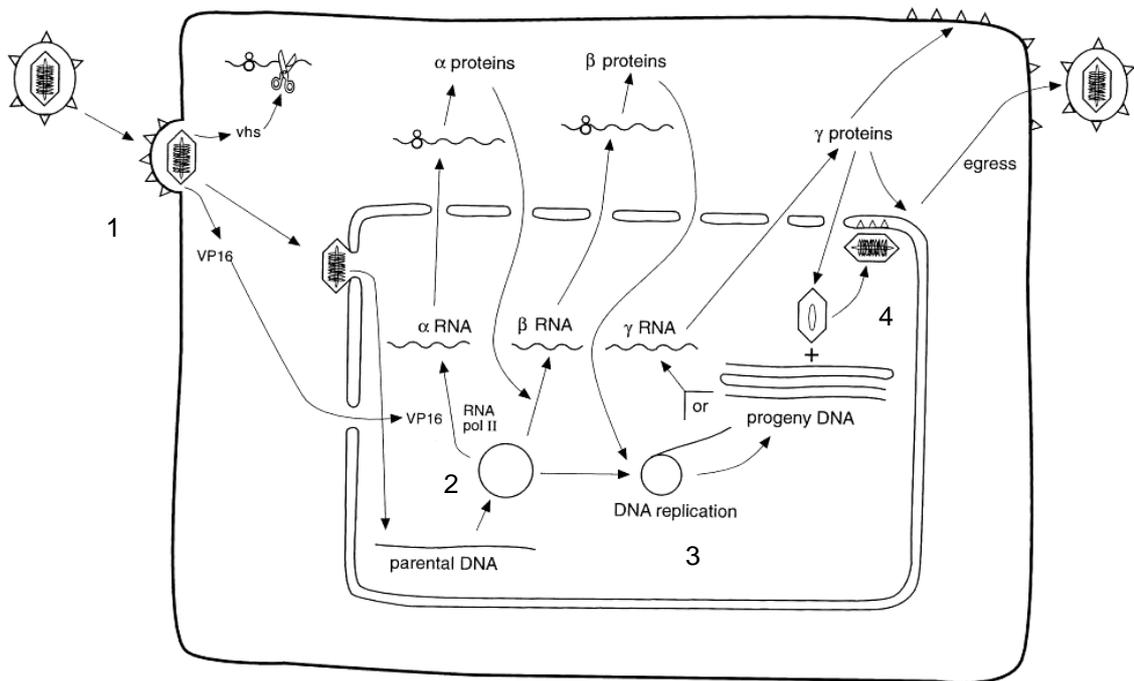


Abbildung 3: Replikationszyklus von HSV (Nach Roizman, 2001).

1.2 Epidemiologie

HSV-1 und HSV-2 sind weltweit verbreitet. In manchen Regionen und Risikogruppen (Prostituierte, HIV-Infizierte) mit einer Durchseuchungsrate von nahezu 100%. Die Übertragung von HSV-1 erfolgt meist früh zwischen Mutter und Kind, unter Geschwistern oder Spielkameraden. Ab dem zwanzigsten Lebensjahr findet sich die höchste Seroprävalenz für HSV-1. Die Infektion mit HSV-2 erfolgt meist später im Erwachsenenalter durch sexuellen Kontakt. In Phasen der Latenz scheidet der Betroffene normalerweise kein Virus aus. Inapparente Reaktivierungen ohne die typischen Symptome, besonders bei HSV-2, können auch zur Ausscheidung von Virus führen und Infektionen hervorrufen (Buxbaum et al., 2003). Bis zu 80% der HSV-2 seropositiven Patienten haben auch Antikörper gegen HSV-1 (Wutzler et al., 2000).

Tabelle 1: Studien zur Erhebung der HSV-Seroprävalenz in Deutschland. Nach Buxbaum et al., 2003.

Studie	Kollektiv	Alter	HSV-1	HSV-2
Doerr et al.,1977	Nicht in Risikogruppen unterteilt	5-10 20-40	36% 72%	
Dannenmaier et al.,1985	Kontrollgruppe Prostituierte	17-61	65,6% 93,2%	7,2% 38,5%
Enzensberger et al.,1991	Kontrollgruppe HIV-Positive	>13	81,2% 93,4%	
Bahrtdt et al.,1992	Kontrollgruppe HIV-Positive Prostituierte	20-59		21,6% 38,9% 65%
Enders et al.,1998	Schwangere			8,9%
Wutzler et al.,2000	Blutspender und stationäre Patienten HIV-Positive	20-39	77,1 91,1%	14,8% 47,9%
Rabenau et al.,2002	Kontrollgruppe Organempfänger HIV-Positive Prostituierte	5-14 15-39 15-39	48-51% 68% 84% 86%	13% 11% 61% 78%

1.3 Klinische Manifestation von HSV

Beim gesunden, immunkompetenten Individuum verläuft die Primärinfektion inapparent oder im Falle einer oralen Infektion in Form der sehr schmerzhaften Gingivostomatitis herpetica. Die Viren wandern entlang der Axone und verbleiben latent in den zugehörigen Ganglien (z.B. Ganglion Gasseri), von wo aus rekurrende Infektionen erfolgen können. Die häufigste sexuell übertragbare Krankheit ist der Herpes genitalis, der bei Schwangerschaft/Geburt auf das Kind übertragen werden kann. Zur Vermeidung von Herpes neonatorum muß bei primärem oder rekurrentem Herpes genitalis während der Schwangerschaft ein regelmäßiger Virusnachweisversuch erfolgen und gegebenenfalls eine Sectio durchgeführt werden. Bis zu 75% der Fälle von Herpes neonatorum verlaufen letal (Buxbaum

et al.,2003). Sehr ungewöhnlich ist die Herpes Meningoenzephalitis (1:1Million Einwohner pro Jahr), mit einer Letalität von 50%, wobei 50% der Überlebenden Restschäden davontragen. Herpesinfektionen können auch für idiopathische Fazialispareesen ursächlich sein.

Tabelle 2 :Verschiedene klinische Manifestierungen und der normalerweise involvierte HSV-Typ.

Primärinfektion	Rekurrente Infektion
Gingivostomatitis herpetica HSV-1	Herpes labialis HSV-1
Keratokonjunktivitis herpetica HSV-1	
Vulvovaginitis herpetica HSV-1/HSV-2	
Herpes proenitalis HSV-1/HSV-2	
Herpes gladiatorum HSV-1	
Herpes neonatorum / Herpesenzephalitis HSV-1/HSV-2	
Viszerale disseminierte Herpes simplex Infektion HSV-1/HSV-2	

1.3.1 HSV und Stammzelltransplantation

Bei immungeschwächten oder immunsupprimierten Personen kann es zu disseminierten HSV-Infektionen kommen. Eine Untersuchung in Frankreich ergab, dass 9% der Patienten nach autologer oder allogener Stammzelltransplantation eine HSV-Infektion erleiden (Morfin et al., 2004). Es kann dabei zu ausgedehnten in die Tiefe gehenden mukokutanen Infektionen kommen (Saijo et al., 2002a). Desweiteren zur Ausbildung einer interstitiellen Pneumonie, Hepatitis, und Infektionen des Dünndarms.

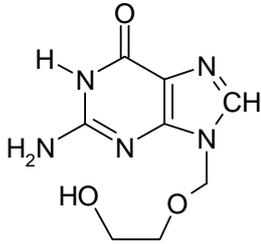
1.4 Antivirale Therapie von HSV

1.4.1 Entwicklung antiviraler Substanzen

Lange Zeit schien es unwahrscheinlich ein Medikament zu finden, welches die Virusreplikation hemmt und gleichzeitig die eukariotische DNS und die Zellreplikation nicht behindert. Die ersten wirksamen Substanzen waren 5-Iododesoxyuridin (1959) und 5-Trifluoromethyldeoxyuridin (1964). Sie können nur topisch angewendet werden, da sie systemisch viel zu toxisch sind (Field, 2001). 1968 wurde Adenin Arabinosid entdeckt, welches auch systemisch verabreicht werden kann. 1974 gelang Howard Schaeffer und Lilia Beauchamp bei Wellcome die Synthese von Aciclovir (ACV). Es ähnelt dem 2-

Desoxyguanosin, es fehlen aber das 2'- und 3'-C-Atom des Desoxyribose-Rings. Seine antivirale Wirkung konnte in vitro nachgewiesen werden (Elion et al., 1977 und Schaeffer et al., 1978). ACV wurde 1981 zugelassen. Die ersten Fälle von klinischer ACV-Resistenz wurden bereits ein Jahr später dokumentiert (Crumpacker et al., 1982, Siebrack et al., 1982). Dies war der Anfang einer Reihe verschiedener Nukleosidanaloga wie Ganciclovir, Famciclovir (Zulassung 1994), Valaciclovir (Zulassung 1995) und Penciclovir (Zulassung 1996). Von einer schwedischen Arbeitsgruppe wurde 1978 erstmals die antivirale Wirksamkeit von Phosphonoameisensäure (Foscarnet, PFA) beschrieben (Helgstrand et al., 1978). Für die Behandlung von HSV bei ACV-Resistenz wurde es 1995 zugelassen. Eine weitere neue Klasse antiviral wirkender Substanzen ist das von De Clercq erstmals beschriebene Nukleotidanalogen Cidofovir (CDV) (De Clercq et al., 1986). Das relativ breite Wirkungsspektrum dieser Nukleotidanaloga, zu denen ausser Cidofovir auch Tenofovir und Adefovir gehören, beruht auf der ausschließlichen Aktivierung durch zelleigene Kinasen. Derzeit sind 37 Medikamente zur Behandlung von viralen Erkrankungen zugelassen, davon allein 19 für die Behandlung von HIV-Infektionen, 7 für die primäre Behandlung von HSV Infektionen (De Clercq, 2004). Im Falle einer auftretenden Resistenz gegen ACV bestehen fast immer Kreuzresistenzen gegenüber den anderen Nukleosidanaloga und eine Alternative ist dann nur noch PFA bzw. CDV. Die neueste Entwicklung repräsentieren derzeit zwei unterschiedliche in vitro und in Tiermodellen hochpotente HSV Helicase-Primase Inhibitoren (BILS 179 BS und BAY 57-1293), die in klinischen Studien getestet werden sollen (Crute et al., 2002; Kleymann et al., 2002). Diese beiden Substanzen stehen stellvertretend für eine Reihe neuer Substanzklassen für die Behandlung von HSV Erkrankungen. Jeder in Abbildung 3, auf Seite 11 dargestellte Schritt ist theoretisch auch eine mögliche Angriffstelle für neue Virostatika. Ausser den Helicase-Primase Inhibitoren werden derzeit zwei Ribonukleotidreduktase Inhibitoren, ein neuer Thymidinkinase Inhibitor, ein Protease Inhibitor und zwei DNS Polymerase Inhibitoren untersucht (Kleymann, 2003). Es ist noch nicht gelungen einen effektiven Impfstoff gegen HSV-1 und HSV-2 zu entwickeln (Kleymann, 2003).

1.4.2 Aciclovir (ACV)



(9-(2-Hydroxyethoxymethyl)guanin)

Wirkstoff: Aciclovir-Natrium
Summenformel: $C_8H_{11}N_5O_3$
Molekulargewicht: 225,2

Anwendung

Aciclovir wird zur Therapie als Infusion bei Herpes genitalis und Herpes Simplex Enzephalitits verwendet. Patienten mit einer Immunschwäche, hervorgerufen durch HIV, sowie immunsupprimierte Patienten bei Organ- oder Stammzelltransplantationen werden in der Regel ebenfalls über Infusion behandelt. Für die Prophylaxe bei stark immunsupprimierten Patienten werden 4 Einzeldosen von je 400 mg empfohlen. Dies setzt eine ausreichende enterale Resorption voraus. (GlaxoSmithKline, 2003). Für die topische Behandlung von Herpes labialis steht eine apothekenpflichtige Salbe zur Verfügung. Desweiteren gibt es eine Augensalbe.

Pharmakodynamik

Aciclovir wird von der HSV-Thymidinkinase (HSV-TK) zu Aciclovir-Monophosphat phosphoryliert (Abbildung 4, Seite 17). Ein zelluläres Enzym, die Desoxyguanosinmonophosphat-Phosphotransferase phosphoryliert zum Aciclovir-Diphosphat. Der dritte Schritt wird von verschiedenen zellulären Enzymen, unter anderem der Phosphoglycerat-Kinase, bewältigt (Miller und Miller, 1980 und 1982). Das entstandene Aciclovir-Triphosphat verdrängt kompetitiv Desoxyguanosin-Triphosphat von der Substrat-Bindungsstelle der Virus-DNS-Polymerase. Weil das 3'-C-Atom fehlt, ist keine 3'-5'-Phosphodiesterbindung mehr möglich, woraus ein Kettenabbruch resultiert. Für

die selektive Wirksamkeit entscheidend ist das Vorhandensein der HSV-TK. Die zelluläre Thymidinkinase phosphoryliert Aciclovir 30-120mal langsamer als die HSV-TK. Diese selektive Wirksamkeit wird von der, im Vergleich zur HSV-kodierten DNS-Polymerase, 10-30fach geringeren Affinität des Aciclovir-Triphosphats zu der zellulären DNS-Polymerase unterstützt. Weitere Untersuchungen ergaben eine 4-8mal höhere Konzentration von ACV in mit HSV infizierten Vero-Zellen gegenüber nicht infizierten Zellen (Elion et al., 1977). Diese spezifische Wirksamkeit in der Zellkultur zeigt sich deutlich wenn man die zytotoxisch wirksame Konzentration der inhibitorischen Konzentration gegenüber stellt. Dazu wird der CC_{50} -Wert durch den IC_{50} -Wert dividiert. Daraus resultiert der therapeutische Index für Zellkulturen, auch Selektivitätsindex (SI) genannt. Der CC_{50} Wert für Vero-Zellen liegt bei einer Konzentration von $ACV = 300\mu M$. Elion untersuchte unter anderem einen sehr ACV sensitiven HSV-Stamm (H-29) mit einer $IC_{50} = 0,1\mu M$ und erhielt so einen Index für ACV von 3000 (Elion, 1982).

Pharmakokinetik

Nach einer Infusion von 5 mg/kg konnte eine Plasmahöchstkonzentration im „Steady-State“ von $33,7\mu M$ gemessen werden. Die Bioverfügbarkeit von Aciclovir in Tablettenform beträgt 20%. Die Eiweißbindung liegt zwischen 9 und 33%. Die Konzentration im Liquor liegt 50% unter der Serumkonzentration. Beim Nierengesunden beträgt die Plasmahalbwertszeit knapp 3 Std. Dabei wird das Aciclovir zum größten Teil über die Nieren in unveränderter Form, bis zu 15% als 9-Carboxymethoxymethylguanin ausgeschieden. Die Ausscheidung kann mit Probenecid um 30% verringert werden. Dies bedarf jedoch keiner Dosisanpassung, da die therapeutische Breite groß ist (GlaxoSmithKline, 2003).

Nebenwirkungen

Die Anwendung von Aciclovir ist relativ selten mit Nebenwirkungen verbunden. Bei Infusionen sind dies Krampfanfälle, Psychosen, Schläfrigkeit, Halluzinationen und Verwirrtheit. Anämien, Thrombozytopenien und Leukozytopenien wurden beobachtet. Bei Tablettengabe kann es selten zu

Haarausfall kommen, jedoch ist es nicht eindeutig auf die Einnahme zurückzuführen.

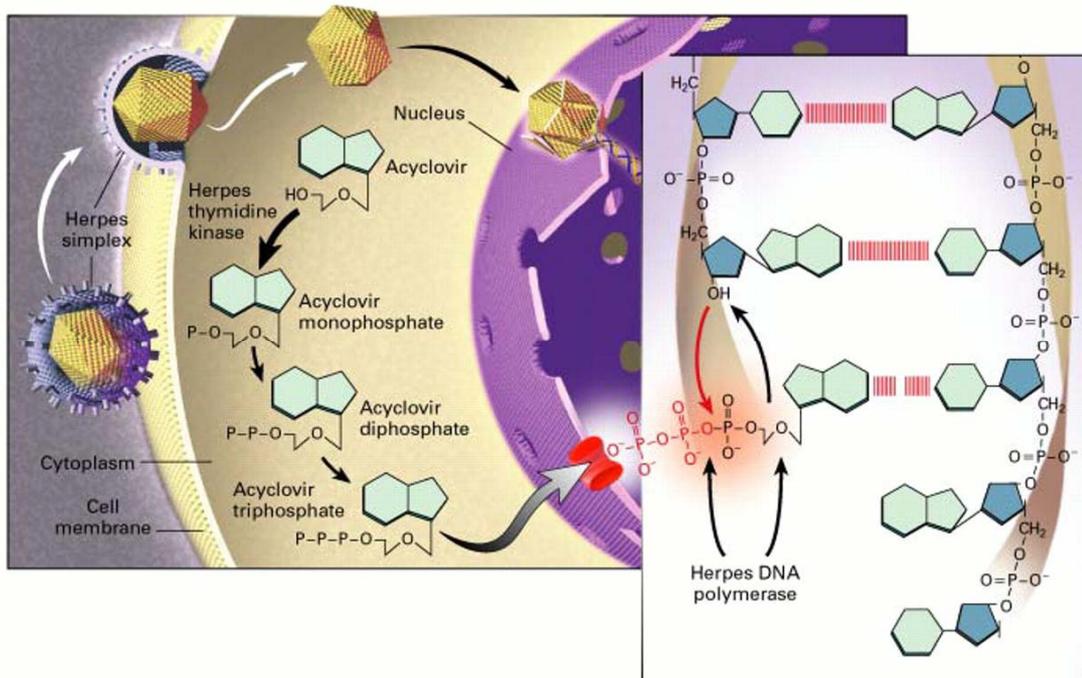
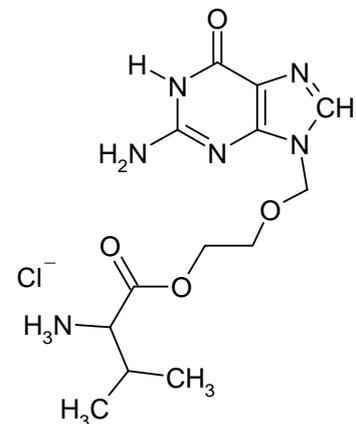


Abbildung 4: ACV-Aktivierungsmechanismus (Balfour, 1999).

1.4.3 Valaciclovir (VACV)

L-Valin Ester von Aciclovir
Wirkstoff: Valaciclovirhydrochlorid

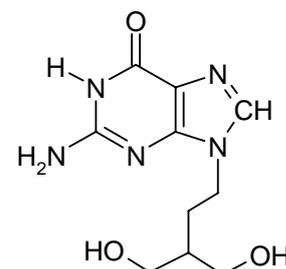
Valaciclovir (VACV) ist das orale Prodrug von Aciclovir (ACV). Es wird im Körper von Esterasen zu ACV hydrolysiert und der einzige Unterschied ist die höhere Bioverfügbarkeit von über 50%.



1.4.4 Penciclovir (PCV)

9-(4-hydroxy-3-hydroxymethyl-but-1-yl)guanin

Penciclovir ist auch ein Nucleosidanalogen und wird derzeit nur topisch als Creme verwendet. Das Wirkungsspektrum umfasst HSV-1 und 2 sowie VZV.

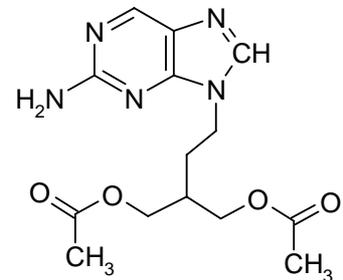


Aufgrund seiner Struktur kommt es zu keinem absoluten Kettenabbruch.

1.4.5 Famciclovir (FCV)

Diacetyl Ester von Penciclovir

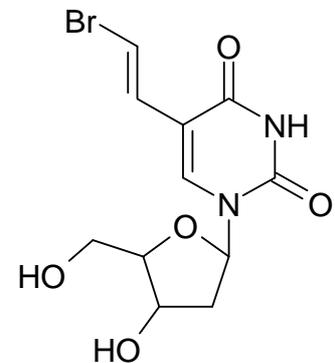
Famciclovir (FCV) ist das orale Prodrug von Penciclovir mit demselben Wirkungsspektrum nach der Metabolisierung. Eine Wirkung gegen Hepatitis B wurde in vitro festgestellt (Balfour, 1999).



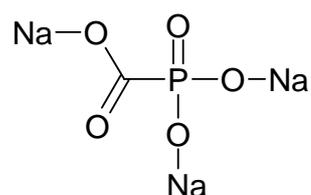
1.4.6 Brivudin (BVDU)

(E)-5-(2-bromovinyl)-2'-desoxyuridin
Wirkstoff: Bromovinyldeoxyuridin

Brivudin (BVDU) wird bei Herpes Zoster und schweren Infektionen mit HSV-1 gegeben. Die Wirksamkeit beruht auf der Ähnlichkeit mit Thymidin. Es wird in die virale DNS eingebaut, bewirkt aber keinen absoluten Kettenabbruch.



1.4.7 Foscarnet (PFA)



Wirkstoff: Foscarnet-Natrium-Hexahydrat
Summenformel: $\text{Na}_3\text{CO}_5\text{Px6H}_2\text{O}$
Molekulargewicht: 300,1

Anwendung

Nach Herstellerangaben ist Foscarnet (PFA) nur für die Behandlung von AIDS-Patienten, mit Cytomegalovirusinfektionen oder ACV-resistenten Herpes Simplex Virusinfektionen vorgesehen. Da es momentan keine große Auswahl

an alternativen Medikamenten bei ACVres HSV Infektionen gibt, wird Foscarnet auch bei immunsupprimierten Patienten nach SZT angewendet. Foscarnet gibt es nur als Infusion. Bei ACVres HSV Infektionen werden 3-mal täglich 40 mg Foscarnet-Natrium/kg KG mit einem Abstand von 8 Stunden verabreicht. Wegen der Nephrotoxizität soll vor der Infusion mit 1 l 0,9%iger NaCl-Lsg. für eine ausreichende Diurese gesorgt werden, ebenso nach der Infusion (AstraZeneca, 2003).

Pharmakodynamik

Das Wirkungsspektrum umfasst das Cytomegalovirus, das Herpes Simplex Virus 1 & 2, das Varizella-Zoster Virus, das humane Herpesvirus 8 und HIV Typ 1 (Balfour, 1999). Als Pyrophosphatanalogon wirkt es an der Pyrophosphat-Bindungsstelle der viralen DNS-Polymerase. Dadurch ist die virale DNS-Polymerase nicht mehr in der Lage, Pyrophosphat von den Nukleotiden abzuspalten (Balfour, 1999). Für die meisten suszeptiblen HSV 1 & 2 Stämme liegen die IC₅₀-Werte zwischen 10 und 100µM PFA (AstraZeneca, 2003; Saijo, 2002). Der CC₅₀-Wert für PFA liegt für menschliche Zellen bei 1000µM (AstraZeneca, 2003). Die therapeutische Breite fällt somit geringer aus als bei Aciclovir.

Pharmakokinetik

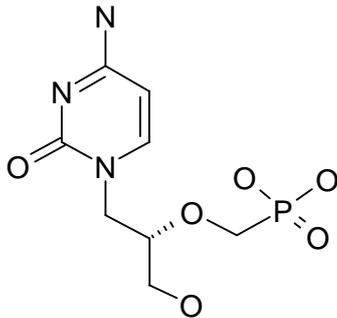
In einer klinischen Studie wurde Probanden über eine kontinuierliche Infusion 7,4-11,8 mg/kg KG PFA pro Stunde verabreicht. Die gemessenen Plasmaspiegel betragen 75-265µM PFA (AstraZeneca, 2003). Die Plasmaeweißbindung liegt unter 20%. PFA wird ohne Metabolisierung über die Nieren eliminiert. Die mittlere Plasmahalbwertszeit beträgt 4 Stunden. Die Eigenschaft von PFA sich im Knochen einzulagern, kann die Halbwertszeit auf bis zu 8 Tage verlängern (AstraZeneca, 2003).

Nebenwirkungen

Problematisch ist bei der Behandlung die Nephrotoxizität, die, auch trotz 0,9%iger NaCl Zuführung prä- und postinfusionem, als häufigste Nebenwirkung auftritt. Zweithäufigste Nebenwirkung ist das Absinken von Serumkalzium, bewirkt durch die Eigenschaft von PFA Chelatkomplexe mit zweiwertigen

Metallionen zu bilden. Folge sind Krämpfe und Parästhesien. Durch regelmäßige Kontrolle der Elektrolyte kann dies vermieden werden (AstraZeneca, 2003).

1.4.8 Cidofovir (CDV)



(1-(S)-(3hydroxy-2-phosphonomethoxypropyl)cytosin)

Summenformel: $C_8H_{14}N_3O_6P$

Molekulargewicht: 315,2 ($\times 2H_2O$)

Molekulargewicht: 279,2 (wasserfrei)

Anwendung

Cidofovir ist für die Therapie von CMV-Retinitis bei AIDS Patienten bestimmt. Bei HSV Infektionen findet es nur Anwendung, wenn eine ACV- und PFA-Resistenz nachgewiesen ist. Die Anwendung ist durch die hohe Nephrotoxizität begrenzt (DeClercq, 2003; Pharmacia&Upjohn, 1998). Deshalb ist die Gabe von Probenecid und eine ausreichende Hydratisierung mit physiologischer Kochsalzlösung therapiebegleitend notwendig. Die Initialbehandlung sieht zwei Infusionen mit 5 mg/kg Körpergewicht in zwei Wochen vor. Als Erhaltungstherapie werden alle zwei Wochen 5 mg/kg Körpergewicht gegeben (Pharmacia&Upjohn, 1998). Bisher war es nur als Infusion zugelassen. In multizentrischen Studien erfolgte die topische Anwendung von 1, 3, und 5%igem Cidofovir Gel bei rekurrentem Herpes genitalis (De Clercq, 2003). Eine 1%ige Creme ist mittlerweile verfügbar.

Pharmakodynamik

Das Wirkungsspektrum von Cidofovir als Nukleotidanalogen ist wesentlich größer, als das der Nukleosidanaloga. Es wird von zellulären Kinasen zweimal

zu Cidofovir-Diphosphat, dem eigentlichen Triphosphat-Analogon, phosphoryliert. Die Phosphorylierung erfolgt virusunabhängig auch in nicht infizierten Zellen durch zelluläre Kinasen (De Clercq, 2003; Hitchcock et al., 1996). CDV-Diphosphat ist Substrat der viralen DNS-Polymerase und bewirkt am 3`-Ende der DNS eine thermodynamische Destabilisierung und infolgedessen einen Kettenabbruch.

Pharmakokinetik

Für die Referenzstämme KOS, F und McIntyre wird ein mittlerer IC₅₀ von 13µM CDV in der Literatur angegeben (Hitchcock et al., 1996). Der Selektivitätsindex liegt zwischen 5-1000 für die verschiedenen suszeptiblen Virusarten (De Clercq, 2003; Hitchcock et al., 1996). Interessant ist die größere Sensitivität bei ACVres HSV Stämmen in vitro (Saijo et al., 2002). Es wird mit der unzureichenden Fähigkeit dieser Stämme zur Metabolisierung von ausreichend dCTP durch die Thymidinkinase erklärt. CDV-Diphosphat wird dadurch ein geeigneteres Substrat für die virale Polymerase (Mendel et al., 1995a). Die lange Halbwertszeit ist auf die intrazelluläre Speicherung von CDV Metaboliten zurückzuführen (De Clercq, 2003; Hitchcock et al., 1996).

Nebenwirkungen

Mit 51% die häufigste Nebenwirkung ist eine Proteinurie, die als frühzeitiger Indikator für die Nephrotoxizität gilt (Pharmacia & Upjohn, 1998).

1.4.9 Breites Wirkungsspektrum „HSV-spezifischer“ Virostatika

ACV ist auch bei einigen anderen Herpesviren wirksam (Tabelle 3). Die breitesten Wirkungsspektren zeigen PFA und CDV.

Tabelle 3: *Das Wirkungsspektrum der Nucleosidanaloga VACV, FCV und PCV entspricht weitgehend dem von ACV. **bis auf PML (Progressive Multifokale Leukenzephalopathie) und Kaposi-Sarkom (beides im Spätstadium einer HIV-Infektion) sind nur Krankheitsbilder aufgelistet, die üblicherweise bei immunkompetenten Individuen auftreten. ***Wirkungsspektrum von PFA und CDV nicht vollständig aufgelistet. Quellen: Balfour, 1999; De Clercq, 2003 und 2004; GlaxoSmithKline, 2003.

Virus	Virostatika wirksam gegen HSV*				Erkrankung**
	ACV	Brivudin	PFA***	CDV***	
Herpesviren:					
<i>HSV-1</i>	+	+	+	+	Fieberbläschen
<i>HSV-2</i>	+		+	+	Genitaler Herpes
<i>VZV</i>	+	+	+	+	Windpocken, Gürtelrose
<i>CMV</i>	(+)		+	+	Zytomegalie
<i>EBV</i>	+		+	+	Drüsenfieber
<i>HHV-6</i>				+	Erythema subitum
<i>HHV-7</i>				+	Symptomlos?
<i>HHV-8</i>			+	+	Kaposi-Sarkom
Adenoviren				+	Atemwegsinfektionen
Papovaviren:					
<i>Polyomavirus</i>				+	PML
<i>Papillomavirus</i>				+	Warzen
Poxviren:					
<i>Variola-Virus</i>				+	Pocken
<i>Vaccinia-Virus</i>				+	Kuhpocken
Retroviren:					
<i>HIV</i>			+	+	AIDS

1.5 Resistenzmechanismen bei HSV

Zwei Genprodukte sind derzeit das Ziel der antiviralen Therapie einer HSV-Infektion: Die HSV Thymidinkinase (TK) und die HSV DNS-Polymerase. Dabei ist die DNS-Polymerase sekundär auch das Ziel von Virostatika, welche primär die TK involvieren. Mutationen innerhalb der TK sind bei Behandlung mit ACV am häufigsten. 95% von ACV-resistenten Isolaten zeigen einen kompletten Verlust der TK-Aktivität (Morfin und Thouvenot, 2003; Bacon et al., 2003). Die TK-Aktivität wird mit radioaktiv markiertem ACV und Thymidin bestimmt (Tabelle 4). Die TK stellt den primären Angriffspunkt dar, die Virusreplikation

kann aber auch ohne sie erfolgen. Das Vorhandensein einer funktionellen DNS-Polymerase ist dagegen essentiell für die Virusreplikation, weshalb dort Mutationen seltener auftreten. Resistenzen gegenüber Pyrophosphatanaloga, deren Ursache Mutationen innerhalb der DNS-Polymerase sind und auch Resistenzen gegenüber Nukleotidanaloga, wie Cidofovir, können Kreuzresistenzen gegenüber den Nukleosidanaloga bewirken (Gilbert et al., 2002).

Tabelle 4: Phänotypische Unterteilung der verschiedenen Resistenzmechanismen gegenüber Aciclovir.

Thymidinkinase mit veränderter Substratspezifität:	TK altered (TK Aktivität >15%)
Verringerte Produktion von Thymidinkinase:	TK low producer (TK Aktivität 1-15%)
Kompletter Verlust der Thymidinkinaseaktivität (am häufigsten):	TK deficient (TK Aktivität <1%)
HSV DNS-Polymerase mit veränderter Substratspezifität:	DNA pol altered

1.5.1 Mutationen innerhalb von UL 23

Die Thymidinkinase (TK) ist ein Protein aus 376 Aminosäuren (AS) und wird von dem 1128 bp zählenden Genabschnitt UL 23 kodiert. Die ATP Bindungsstelle erstreckt sich von AS 51-63, die Nukleosid Bindungsstelle von AS 168-176 (Darby et al., 1986). Fünf konservierte Regionen sind beschrieben: AS 50-66, 79-91, 162-178, 212-226, und 281-292 (Balasubramaniam et al., 1990). UL 23 unterliegt einem ausgeprägten Polymorphismus. Es sind eine Vielzahl von Mutationen beschrieben, die nicht mit Resistenzen in Verbindung stehen. Diese Mutationen sind über den gesamten Genabschnitt verteilt. Mutationen, die nicht mit Resistenz gegenüber ACV in Verbindung stehen, liegen ausserhalb von aktiven und konservierten Regionen (Morfin und Thouvenot, 2003). Bei der Hälfte aller resistenzverursachenden Mutationen handelt es sich um Frameshiftmutationen, die durch Insertionen oder Deletionen bewirkt werden (Morfin und Thouvenot, 2003; Saijo et al., 2002). Hot Spots für Deletionen und Insertionen innerhalb der TK sind homopolymere Sequenzen von Guanin und Cytosin. Die am häufigsten beschriebene

Frameshiftmutation, assoziiert mit ACV-Resistenz in solch einer homopolymeren Sequenz, liegt im Codon 146 (Morfin und Thouvenot, 2003). Die andere Hälfte der Mutationen zeigt einzelne Substitutionen in konservierten und nichtkonservierten Abschnitten (Gilbert et al., 2002).

Tabelle 5: Mit ACV-Resistenz assoziierte Mutationen innerhalb des für die TK kodierenden Gens UL 23 bei HSV-1. Nach Gilbert et al., 2002, Saijo et al., 2002b, Stranska et al., 2004b.

	ATP Bindungsstelle	Nukleosid-bindungsstelle	C-terminale Region	Andere konservierte Regionen	Nichtkonservierte Regionen
Aminosäure Substitution	R51W	A168T	C336Y	E83K	Q104H
	D55N	P173R		P85S	Q104Stop
	P57H	A175V		R216C/H	H105P
	H58R	R176Q		R220C	G129D
	K62N			R222C/H	G144N
	T63I			T245M	A189V
	T65N			R281Stop T287M	G200C T201P
Addition Deletion	Del. A nt 184 (Stop AS 85)				
	Del. A nt 227 (Stop AS 85)				
	Add. G nt 430 (Stop AS 304)				
	Del. C nt 460 (Stop AS 182)				
	Del. C nt 548 (Stop AS 408)				
	Del. C nt 666 (Stop AS 408)				
	Del. C nt 1061 (Stop AS 408)				
Del. A nt 1065 (Stop AS 375)					

Tabelle 6: Mutationen im Rahmen des Genpolymorphismus des TK Gens bei HSV-1. Mit * versehene Aminosäuresubstitutionen sind nach Morfin et al. wahrscheinlich dem Genpolymorphismus zuzurechnen. Nach Morfin et al., 2000a; Bestman-Smith et al., 2001; Stranska et al., 2004b.

	Natürlicher Polymorphismus			
Aminosäure Substitution	C6G	D77N*	G251C	L364P*
	A17V*	M85I	V267L	E374A*
	S23N*	Q89R	P268T	M367T
	E36K*	A192V	R281Q*	N376H/P
	R41H	I214T	D286E	
	L42P*	G240E	V348I	

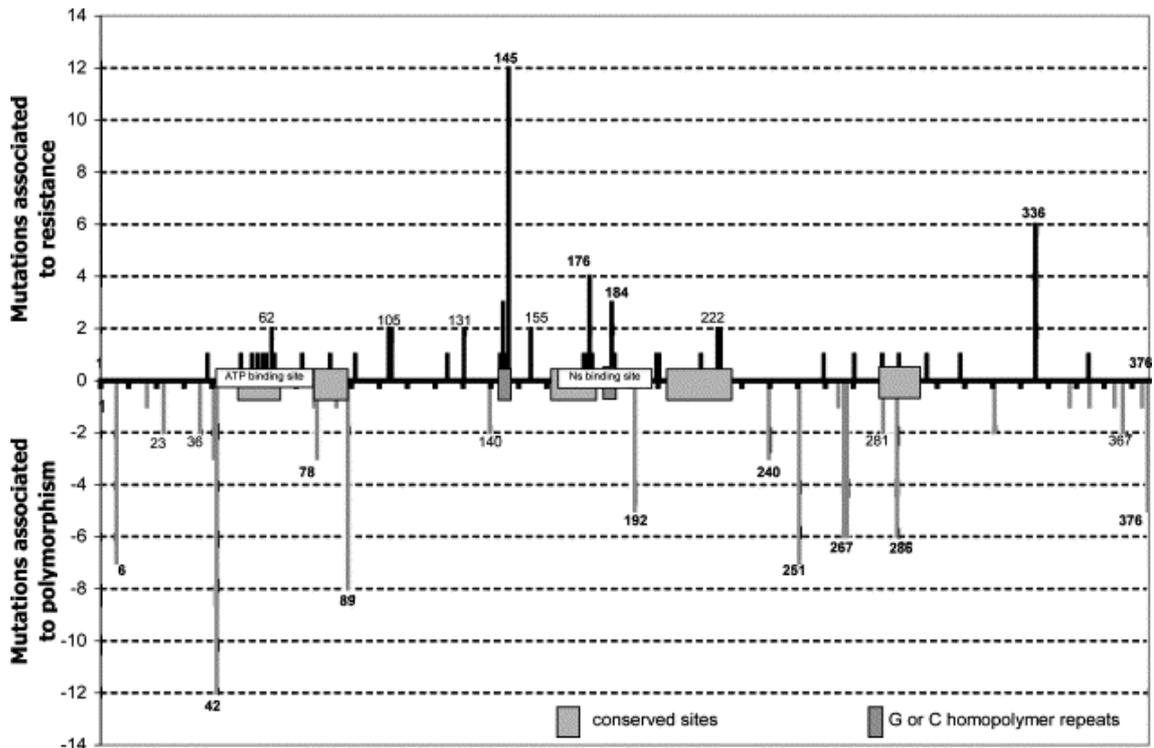


Abbildung 5: Schematische Darstellung von UL 23, Lokalisation der Mutationen. Die häufigsten Mutationen sind in dem 7G-Homopolymer (Codon 144-146) beschrieben. (Morfin und Thouvenot, 2003)

1.5.2 Mutationen innerhalb von UL 30

Die HSV DNS-Polymerase ist ein Protein aus 1235 Aminosäuren mit acht konservierten Regionen. Auch das Polymerase Gen unterliegt einem Polymorphismus. Mutationen die ACV-Resistenz bewirken, treten am häufigsten in den Regionen II und III auf (Morfin und Thouvenot, 2003). Die häufigste Mutation bei ACV- und PFA-resistenten HSV-1 Laborstämmen liegt in Region II in Codon 724 (Ser724Asp) (Gilbert et al., 2002).

1.6 Resistenzen – Inzidenz und Prävalenz

Alle großen Studien der letzten Jahre ergaben, dass die Prävalenz von ACV-resistenten Infektionen unter Immunkompetenten innerhalb der Bevölkerung mit lediglich 0,1-0,6% sehr gering ist (Christophers et al., 1998; Danve-Szatanek et al., 2003). Innerhalb der letzten 20 Jahre hat die Inzidenz von ACV-resistenten Infektionen nicht zugenommen (Field, 2001; Bacon et al., 2003). Dies lässt sich mit der HSV-Latenz erklären: Auch im Fall einer Resistenz verbleibt der ursprüngliche HSV-Stamm in den infizierten Ganglien und dient als Template.

Resistente Virusstämme zeigen eine veränderte Virulenz und sind, bis auf wenige beschriebene Fälle, nicht in der Lage aus dem Stadium der Latenz zu reaktivieren (Field, 2001). Bis jetzt ist nicht geklärt, ob resistente Stämme überhaupt latent persistieren können. Bei 4-14% aller immunsupprimierten Patienten treten Resistenzen gegenüber ACV auf (Englund et al., 1990; Christophers et al., 1998; Danve-Szatanek et al., 2003). Mit Abstand am häufigsten treten jedoch ACV-Resistenzen bei SZT-Empfängern auf. In dieser Gruppe treten bei 9% der Patienten HSV-Infektionen auf und das höchste Risiko eine ACV-Resistenz zu entwickeln haben hier Patienten nach allogener Transplantation mit bis zu 30% (Morfin et al., 2004). Bisher wurden nur wenige klinische PFA-Resistenzen beschrieben (Saijo et al., 2002a; Gilbert et al., 2002).

1.7 Methoden zum Nachweis einer Resistenz

1.7.1 Phänotypischer Test

Ein phänotypischer Nachweis für Viren erlaubt es, Viren, nach Infektion von geeigneten Zielzellen, durch das Auftreten von den für das entsprechende Virus typischen zelldegenerativen Effekten (CPE), indirekt sichtbar zu machen. Es ist so möglich, in Gegenwart von geeigneten Virostatika, die Suszeptibilität eines Virusisolats über die Reduktion des CPEs zu ermitteln. Die am häufigsten angewandte Methode für den Nachweis der Suszeptibilität von HSV gegenüber ACV, ist der Plaquereduktionstest, wie er von Herrmann zum ersten mal beschrieben wurde (Herrmann, 1961). Zellmonolayer werden mit einer Virusverdünnung inokuliert. Wenn die Adsorption abgeschlossen ist, werden verschiedene Virostatikaverdünnungen hinzugefügt, Viruswachstumskontrollen ohne Virostatikum induzieren 100% Virusreplikation bzw. 0% Virusinhibition. Im Zellrasen gebildete Plaques, werden nach 2-3 Tagen gezählt und als prozentualer Anteil gegen den log₁₀ der Virostatikakonzentration graphisch aufgetragen. Daraus kann man die 50%ige inhibitorische Dosis (ID₅₀ oder IC₅₀), die Virostatikakonzentration, bei welcher das Viruswachstum um 50% reduziert ist, ablesen. Manche Autoren geben auch zusätzlich die 90%ige inhibitorische

Dosis, als zusätzlichen Indikator für die Suszeptibilität an. Für die Validität des Tests soll immer ein sensitiver Referenzstamm und wenn möglich ein prätherapeutisches Isolat mitgeführt werden. Ursprünglich wurde der Zellrasen mit einem festen Agarosemedium überlagert, um bei HSV die Ausbildung von singulären Plaques zu ermöglichen. Bei HSV ist derzeit die Überlagerung mit einem 0,5-1%igen Methylcellulosemedium üblich (Hotchin, 1955). Wegen dem zähflüssigen Charakter solch eines Zellulosemediums dürfen die Testplatten während der Inkubation nicht bewegt werden, um die Ausbildung von sekundären Plaques zu verhindern. Der Plaquereduktionstest existiert in vielfältigen Modifikationen und andere Methoden wurden im Vergleich mit dem Plaquereduktionstest etabliert. Als Screening Methode ist der Dye-uptake Assay beschrieben. Dabei wird photometrisch die Menge an Neutralrot bestimmt, die von noch vitalen Zellen aufgenommen wird (Danve et al., 2002). Eine andere Testmethode wird mit einer Zelllinie durchgeführt, welche nach Infektion mit HSV β -Galactosidase exprimiert. Nach der Färbung kann der Test photometrisch ausgewertet werden (Tebas et al., 1998; Stranska et al., 2004a). Auch diese Methode ist als Screening beschrieben. Allen Screeningverfahren gemeinsam ist die Verwendung von wenigen undefinierten (nicht vortitrierten) Virus- und wenigen Virostatikaverdünnungen. Bei dem Dye-uptake Screening werden nur zwei Virus- und ACV Verdünnungen verwendet. Von Swierkosz wurde der Suszeptibilitätsnachweis mittels DNS-Hybridisierung beschrieben (Swierkosz et al., 1987). FACS-Analyse (Fluorescence activated cell sorting analysis) erlaubt auch die Bestimmung des IC_{50} -Wertes. Ein interessantes Verfahren ermöglicht die Bestimmung der Suszeptibilität gegenüber ACV durch Expression des TK-Gens eines HSV-Isolates in der Protozoe *Leishmania*. Bei intaktem TK-Gen wird die Protozoe durch Ganciclovir (GCV) inhibiert. Erfolgt keine Inhibition durch GCV liegt eine Resistenz gegenüber ACV vor (Bestman-Smith, 2001).

1.7.2 Schwellenwerte für Resistenz

Derzeit gibt es noch keine Einigung darüber, bei welcher ACV-Konzentration in vitro eine Resistenz vorliegt. Ursächlich dafür ist die Vielzahl der verschiedenen Testmethoden, welche im Vergleich zum Teil recht große Abweichungen der

IC₅₀-Werte produzieren. Safrin et al. legten mit einem Plaquereduktionstest einen Schwellenwert von 2µg/ml ACV und 100µg/ml PFA fest, da die IC₅₀-Werte der meisten Isolate von Patienten, die auf ACV, bzw. auf PFA nicht Ansprachen, darüber lagen (Safrin et al., 1994). Die untersuchten 243 Isolate waren von 115 HIV-Infizierten. Bei knapp 90% der Isolate handelte es sich um HSV-2. Die meisten Autoren berufen sich seither darauf und geben den Schwellenwert mit 2µg/ml ACV an, was 8,9µM ACV entspricht. (Bestman-Smith et al., 2001; Tebas et al., 1997; Swierkosz et al., 1987). Chatis und Crumpacker sehen in diesem hohen Cut-off die Gefahr, dass die Inzidenz von Resistenz unterschätzt wird (Chatis und Crumpacker, 1992). Die Arbeitsgruppe von Morfin wählte für ihren Test einen Wert von 6,5µM ACV (Morfin et al., 2000). Ein noch niedrigerer Wert wurde bei einer Studie in England angewandt. Der Cut-off betrug 3µM ACV (Christophers et al., 1998). Hätte man den höheren Schwellenwert von 8,9µM ACV angewandt, wären von den resistenten 16 Isolaten lediglich 2 als ACV-sensitiv eingestuft worden, deren IC₅₀ bei 3 und 5,5µM ACV lag. Einen objektiveren Schwellenwert erlaubt der Vergleich von einem prätherapeutischen und den darauffolgenden sequentiellen Isolaten. Bei einem 3-5 fachen Anstieg der IC₅₀ für ACV, kann man von einer Resistenz ausgehen (Gilbert et al., 2002). Für Penciclovir wurde in einer Studie Resistenz mit einer IC₅₀ ≥3-fach höher als die mittlere IC₅₀ aller getesteten Isolate festgelegt (Bacon et al., 2003). Für Foscarnet werden auch in Anlehnung an Safrin et al. Cut-off Werte von 330-350µM, bzw. ein 3-facher Anstieg gegenüber dem prätherapeutischen Isolat genannt (Morfin et al., 2000; Gilbert et al., 2002). Die von Safrin et al. genannten 100µg/ml PFA als Cut-off für Resistenz entsprechen 333µM PFA. Gegenüber Cidofovir resistente klinische HSV-Isolate nach SZT sind nicht bekannt. Es könnte daran liegen, daß die meisten ACV-resistenten Isolate eine Hypersensitivität gegenüber CDV zeigen (Saijo et al., 2002). ACV-sensitive HSV-Isolate zeigen aber im Vergleich mit CMV-Isolaten eine wesentlich geringere Suszeptibilität gegenüber CDV. Der IC₅₀-Wert für CDV für die Referenzstämme KOS, F und McIntyre wird mit 13µM und für HSV-2 Referenzstämme mit 32µM CDV angegeben (Hitchcock et al., 1996).

1.7.3 Genotypischer Test

Die genaue Kenntnis von resistenzassoziierten Mutationen und solchen die zu dem natürlichen Polymorphismus der TK zählen ist für die Etablierung eines genotypischen Testverfahrens die Voraussetzung. Ein standardisiertes Verfahren steht noch nicht zur Verfügung. Die Mutationen innerhalb der homopolymeren C- und G-Abschnitte sind einer RFLP Analyse nicht zugänglich. Derzeit besteht die Möglichkeit lediglich darin, das TK-Gen zu sequenzieren und nach bereits beschriebenen, mit Resistenz assoziierten, Mutationen zu suchen. Ebenso wie bei der phänotypischen Resistenzbestimmung ist auch hier ein prätherapeutisches Isolat zum Vergleich mitzuführen, um Mutationen im Rahmen des natürlichen Polymorphismus von UL 23 und solchen, die Resistenz bewirken, voneinander unterscheiden zu können. Eine vielversprechende Möglichkeit könnte die Untersuchung des TK-Proteins mittels Westernblot darstellen. Von 24 ACV-resistenten Laborstämmen konnten bei 21 Abnormalitäten bei der Westernblot Analyse ihrer TK-Proteine festgestellt werden (Saijo et al., 2002b).

1.8 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Transplantation von Stammzellen birgt das Risiko opportunistischer Infektionen, deren adäquate Behandlung für den Erfolg der Transplantation mit entscheidend ist. Den Ausgangspunkt für diese Arbeit bildet die rasche Entwicklung einer Resistenz gegenüber der Behandlung mit Aciclovir (ACV) bei rekurrenten Herpes Simplex Virus (HSV)-Infektionen von Patienten nach Stammzelltransplantation. Eine ACV-Resistenz spielt bei immunkompetenten Individuen bisher nur eine untergeordnete Rolle. Ursache für die Resistenzentwicklung bei der Behandlung mit ACV sind Mutationen innerhalb des Genabschnittes UL 23, welcher bei HSV für die Thymidinkinase (TK) kodiert. Dieses Enzym ist der Angriffspunkt für ACV. Das Nukleosidanalogen ACV wird durch die TK phosphoryliert und nach weiterer Phosphorylierung durch zelleigene Kinasen von der viralen Polymerase (UL 30) in die DNS von HSV eingefügt. Dies führt in der Folge zu einem Kettenabbruch der naszierenden DNS aufgrund fehlender Ausbildung von 3`-5`-Phosphodiesterbrücken. Zu einem geringen Prozentsatz können auch Mutationen innerhalb von UL 30 die Ursache sein. In vitro kann man die ACV-Resistenz eines HSV-Isolates phänotypisch in der Zellkultur bestimmen. Bisher gibt es noch keine Möglichkeit eine ACV-Resistenz bei HSV mit einem schnelleren genotypischen Test sicher zu ermitteln. Das liegt zum einen an der Vielzahl der möglichen Mutationen, zum anderen entzieht sich etwa die Hälfte aller Resistenzen einer leicht durchführbaren RFLP-Analyse, da diese bei HSV in Frameshift-Mutationen begründet sind. Ein probates Mittel wäre also nur die Sequenzierung der betroffenen Genabschnitte. Jedoch resultiert eine weitere Problematik aus dem Vorhandensein eines ausgeprägten natürlichen Polymorphismus innerhalb von UL 23. Sequentielle Isolate sind deshalb für die genotypische Resistenzbestimmung eine *Conditio sine qua non*, weil nur so sensitive und resistente Isolate eines Patienten verglichen werden und dadurch Mutationen, welche dem natürlichen Polymorphismus entstammen, erkannt werden können, die nicht a priori mit Resistenz assoziiert sind. Eine sichere Aussage über die Suszeptibilität gegenüber weiteren Therapieoptionen mit Foscarnet oder Cidofovir kann, bei Vorliegen einer ACV-Resistenz, nur auf

Sequenzierungsdaten basierend bis jetzt noch nicht getroffen werden. Sicher kann eine Aussage zur Suszeptibilität derzeit deshalb nur mit einem phänotypischen Test gemacht werden. Erstes Ziel dieser Arbeit ist somit die Etablierung eines zeit- und arbeitsoptimierten, quantitativen, phänotypischen Testsystems zur Erfassung der Virostatikaresistenz. Dabei soll ein neues auf Chemolumineszenzanalytik beruhendes phänotypisches Verfahren etabliert und im Vergleich zu einem traditionellen Plaqueassay evaluiert werden. Basierend auf der phänotypischen Charakterisierung soll dann die Etablierung der Sequenzierung des UL 23 Genabschnittes von HSV 1 erfolgen. Die zu untersuchenden Herpes Simplex Virusisolate wurden von stammzelltransplantierten Patienten des Universitätsklinikums Tübingen und teilweise von Patienten des Universitätsklinikums Freiburg isoliert. Schließlich soll eine neue, gegenüber HSV möglicherweise wirksame Substanz (N3), die bereits gegen CMV und hier speziell Ganciclovir-resistente CMV Stämme als äusserst potent getestet wurde (Hamprecht et al.), phänotypisch untersucht werden.

2 Material

2.1.1 Humane Vorhautfibroblasten

Die humanen Vorhautfibroblasten (human foreskin fibroblasts, HFF) wurden nach Zirkumzision in der Kinderchirurgie der Universität Tübingen aus den entfernten Vorhautblättern als primäre Zelllinie etabliert.

2.1.2 Vero-Zellen - African green monkey kidney cells

Die Vero-Zellen sind eine permanente Zelllinie aus dem Nierenparenchym der grünen afrikanischen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*) und bilden wie HFF einen Monolayer. Seit den 50er Jahren diente diese Affenart, neben dem Rhesusaffen, zur Gewinnung des Polio-Impfstoffes. Einige Chargen waren damals mit äffischen Viren (z.B. SV40) kontaminiert. Von dieser Affenart wurde 1967 erstmals das hämorrhagische Fieber (Marburg-Viruskrankheit) auf den Menschen übertragen. Es wird auch der Zusammenhang zwischen Viren dieser Affenart und dem humanen HI-Virus diskutiert.

2.1.3 Herpes Simplex Viren

Als sensitiver Referenzstamm wurde der Laborstamm KOS (HSV-1) verwendet (freundlicherweise von Professor Matz, Universität Bonn, zur Verfügung gestellt). Er wurde 1964 von Kendall O. Smith aus einer Lippenläsion isoliert (Smith, 1964). Die Patientenisolate, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, stammen mit einer Ausnahme nur von Patienten nach Stammzelltransplantation, davon 34 aus dem Klinikum Tübingen, 7 aus dem Klinikum Freiburg.

2.2 Lösungen und Kulturmedien für die Zellkultur und die phänotypische Testung

Fetales Kälberserum (FCS)

(Gibco)

30 Minuten bei 56°C im Wasserbad zur Denaturierung von Komplementfaktoren und Proteinasen. Anschließend aliquotiert und bei –20°C eingefroren.

Eaglesches Medium:

Minimal Essential Medium with Glutamax-I (MEM) (Gibco)

Erhaltungsmedium (MEM 1% FCS)

- 500 ml MEM
- 5 ml FCS
- 5 ml Penicillin/Streptomycin (10.000 Units/ml) (Gibco)

Wachstumsmedium (MEM 5% FCS)

- 500 ml MEM
- 25 ml FCS
- 5 ml Penicillin/Streptomycin (10.000 Units/ml) (Gibco)

Einfriermedium für Zellen (nicht infiziert)

- 6,5 ml MEM 5% FCS
- 2 ml FCS
- 1,5 ml Dimethyl Sulfoxide C₂H₆OS (DMSO) (Serva)

Dulbecos Phosphate Buffered Saline (1X) (PBS) (PAA)

Trypsin / EDTA (1x) (PAA)

Trypanblau 0,4% (Sigma)

Methylcellulose, 4000cp (für Methylcellulose-Overlay) (Sigma)

Für eine 1%ige Stammlösung werden 5g Methylcellulose in 500 ml PBS (gekühlt) auf dem Magnetrührer gelöst und anschließend autoklaviert. Nach dem Abkühlen erhält man eine klare visköse Flüssigkeit. Diese Lösung mischt man vor der Anwendung mit MEM 5% FCS zu gleichen Teilen und erhält so ein 0,5%iges Overlay-Medium.

Kristallviolett (Merck)

Lösung zum Fixieren und Färben der Zellen (0,1%)

- 0,1g Kristallviolett
- 50 ml aqua dest.
- 50 ml Ethanol (Merck)

2.3 Lösungen für die HSV-gB-Immunperoxidasefärbung

Primärer Antikörper (Abcam)

Monoklonaler IgG-Maus-Antikörper gegen gB-Antigen von HSV-1 und HSV-2 gerichtet. Verdünnung 1:400 mit PBS, bei 4°C gelagert.

Sekundärer Antikörper

(Dako)

Kaninchen-Anti-Maus-Immunglobulin, mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert.

Verdünnung mit PBS 1:400, bei 4°C gelagert.

AEC-Stammlösung

- 10mg 3-Amino-9-ethyl-Carbazol (Sigma)
- gelöst in 2,5ml N,N-Dimethylformamid (Merck)
- mit 0,1M Natriumacetatpuffer (pH 5,2) 1:20 verdünnen
- sterilfiltriert
- vor Gebrauch 50µl 33% H₂O₂ zugeben (Merck)

Methanol 100%

(Merck)

Alexa-488

(Molecular Probes)

Anti-Maus IgG Antikörper mit Alexa Fluor 488 konjugiert.

1:200 verdünnt.

Aceton

(Merck)

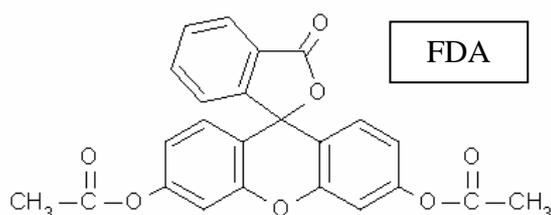
2.4 Lösungen für den A/S-Test

Fluoreszein Diazetat (FDA)

(Sigma)

Stammlösung 10mg/ml in DMSO, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Für die Färbung 1:100 mit PBS verdünnen.



2.5 Virostatika

Aciclovir - Zovirax®

(GlaxoSmithKline)

Durchstechflasche mit 274,4 mg Aciclovir-Natrium als Trockensubstanz. Dies entspricht 250 mg Aciclovir (MG=225,2). In 10 ml PBS gelöst entspricht dies 111µM Aciclovir. Wird nach Aliquotierung bei -80°C aufbewahrt.

Foscarnet - Foscavir®

(AstraZeneca)

1ml der gebrauchsfertigen Infusionslösung enthält 24mg Foscarnet-Natrium-Hexahydrat. Das entspricht 80µM/ml bzw. einer 80mM Stammlösung. Die Stammlösung wird aliquotiert bei Raumtemperatur gelagert.

Cidofovir - Vistide® (Pharmacia)

Durchstechflasche: 375mg/5ml wasserfrei = 75mg/ml = 75g/l

Stammlsg.: $1M/279,2 = x/75$ $x = 0,269M = 270mM$

Die Stammlösung wird bei Raumtemperatur aliquotiert gelagert.

2.6 Lösungen für die DNS-Isolierung

TES Puffer für die Proteinase K

- 10mM Tris, pH 7,8
- 0,5% SDS (Sigma)
- 5mM EDTA pH 8 (Sigma)

Proteinase K, 20mg/ml in Aqua bidest. (Sigma)

Phenol/Chlorophorm/Isoamylalkohol (Roth)

Chlorophorm/Isoamylalkohol (Roth)

3 M Natriumacetat pH 5,2 (Merck)

Ethanol 70% (Merck)

Ampuwa®, ddH₂O (Fresenius)

2.7 Lösungen für die PCR

10 x PCR-Puffer:

- Tris-HCL pH 8,3 mit 500mM KCl (Roche)

MgCl₂-Lösung, 25µM (Roche)

Desoxyribonukleotide (dNTPs) (Roche)

Taq-DNS-Polymerase, 1U/µl (Roche)

Oligonukleotidprimer (Roth)

Primer für UL 23 (Saijo et al., 1999)

S6F: 5` ACA GCG TGC CGC AGA TCT TG 3`

S1R: 5` TAT CGA CAG AGT GGC AGC CC 3`

2.8 Lösungen für die Gelelektrophorese

5 x Elektrophorese-Puffer (TBE)

- 54g Tris-Base (Sigma)
- 27,5g Borsäure (Sigma)
- 20ml 0,5 molare EDTA Stammlsg. pH 8,0
(4,3g EDTA, Dinatrium-Dikalium-Salz in 1l H₂O) (Sigma)
- mit HCl auf pH 8,0 einstellen

Seakem Agarose (BioWhittaker)

Ethidiumbromid-Stammlösung 10mg/ml Aqua bidest. (Sigma)

Probenpuffer

- 0,25% Bromphenolblau (Sigma)
- 0,25% Xylencyanol (Sigma)
- 30% Glycerin (w/v) (Merck)

Größenstandard 250bp DNS-Leiter (Roth)

2.9 Lösungen für den Immunfluoreszenztest

Immagen HSV 1 und 2 Kit (Dako)

PBS (PAA)

Aceton (Merck)

2.10 Lösungen für die DNS Reinigung und Sequenzierung

QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)

Big Dye

Oligonukleotidprimer für UL 23 Sequenzierung (Roth)

(Saijo et al., 1999)

TKpf: 5` CCC GCA CCT CTT TGG CAA GCG 3`

TKf 0: 5` ATG GCT TCG TAC CCC TGC CAT CAA CAC G 3`

TKf 392: 5` CTT ATG CCG TGA CCG ACG CC 3`

TKf 782: 5` AGC TTT CGG GGA CGG CCG TG 3`

Ampuwa[®], ddH₂O (Fresenius)

3 M Natriumacetat pH 5,2 (Merck)

Ethanol 99% (Merck)

Dextranblau, 2mg/ml (Roche)

HPLC Wasser

2.11 Geräte

- Fluorescence Plate Reader BIO-TEK FL600 (BIO-TEK)
- Peltier Thermal Cyclers 200 (MJ Research)
- Speedvac (Eppendorf)
- UV-Spektrophotometer (Eppendorf)
- Mikroskop: Axiovert 200 (Carl Zeiss GmbH)
 - Kamera: Exwave (Sony)
 - Software: AxioVision

2.12 Software

DNAsis[®]

Chromas[®]

SPSS[®]

SigmaPlot[®]

MDLisis Draw[®]

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 HFF und Vero-Zellen

HFF werden für die Anzucht und die bisherige Resistenztestung (CPE-Reduktionstest) von HSV verwendet. Vero-Zellen werden für die Anzucht, den Plaquereduktionstest, den Screening-Plaquereduktionstest und den Aktivitäts- und Selektivitätstest verwendet. Der Umgang mit den Zellen ist ähnlich, man muß lediglich die unterschiedliche Wachstumscharakteristik von HFF und Vero-Zellen beachten. Die HFF sind in niedrigen Zellpassagen (bis etwa Passage 25) bei ca. 80% Konfluenz optimal suszeptibel für die Virusinfektion, wohingegen Vero-Zellen, als permanente Zelllinie, nahezu unbegrenzt passagiert werden können. In großen Kulturschalen (175cm²) werden die Zellen, die einen adhärent wachsenden Monolayer ausbilden, im Brutschrank mit etwa 25ml MEM (1% / 5% FCS) bedeckt gehalten. Nach 1 Woche sollte das Medium spätestens gewechselt werden. Wenn möglich sollten die Zellen alle 2 Tage unter dem Mikroskop begutachtet werden. Bei einer hohen Zelldichte müssen die Zellen passagiert werden. Die Zellen müssen auch regelmäßig auf Mykoplasmen oder sonstige Kontaminationen geprüft werden. Für die Passagierung wird das Medium auf der Arbeitsfläche der Sterilbank abgenommen. Die Zellen werden mit 10ml PBS gewaschen, wobei restliches FCS entfernt wird, welches das Trypsin partiell inaktivieren würde. Nun werden 5ml Trypsin aufgetragen und die Flasche für 5 Minuten im Brutschrank inkubiert. Durch Klopfen werden die Zellen gelöst und dann in 5ml MEM resuspendiert. In einem Falcon Röhrchen werden die Zellen 5 Minuten bei 260 g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und mit entsprechendem MEM (1% / 5% FCS) resuspendiert und auf die neuen Kulturflaschen passagiert, bzw. für die Testung verwendet. Es ist von Vorteil, einen Zellstock anzulegen, speziell für den Fall, wenn Kontaminationen der Zellkultur auftreten. Dafür wird eine dicht bewachsene Kulturschale (175cm²) mit PBS gewaschen, abtrypsiniert, 5 Minuten bei 260 g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in

5ml Einfriermedium resuspendiert. Die Aliquote zu je 1ml werden sofort bei -80°C eingefroren.

Nach dem Auftauen müssen die Zellen abzentrifugiert und in MEM (5% FCS) resuspendiert auf eine Kulturschale gegeben werden.

3.2 HSV-Patientenisolate

Tabelle 7: 41 HSV Isolate von 15 Patienten mit Verdacht auf Aciclovir-Resistenz seit 2000. Bis auf Patient 9 erhielten alle Patienten KMT bzw. PBSZT. RA: Aus Rachenspülwasser isoliert. LA: Lippenabstrich.

Patient	Isolat	Eingang	Material	Diagnose
1	169612	08.09.00	RA/HSV1	Z.v. SZT bei AML
	164511	14.11.00	LA	Z.n. SZT bei AML
	170796	28.02.01	RA	
2	161447	21.03.01	RA/HSV1	Z.n. SZT bei AML
	143491	27.06.01	RA	
3	149502	21.05.01	RA/HSV1	Z.n. SZT bei AML
	165264	03.07.01	RA	
	147567	10.09.01	RA	
	187035	02.10.01	RA	
4	104224	27.06.01	RA/HSV1	Z.n. SZT bei CML
	190413	28.08.01	RA/HSV1	Z.n. SZT bei ALL
147488	04.09.01	RA		
5	147564	10.09.01	RA	
	187037	04.10.01	RA	
6	147391	10.01.02	RA	Z.n. SZT bei ALL
	177015	17.10.01	RA/HSV1	
7	177845	31.10.01	RA/HSV1	Z.n. SZT bei ALL
	182167	14.11.01	RA	
	203923	13.03.02	RA	
8	182367	21.11.01	RA/HSV1	Z.n. SZT bei NHL
	196157	09.01.02	RA	
	196573	16.01.02	RA	
9	205799	26.08.02	RA/HSV1	Bronchial-Ca
	205794	09.09.02	RA	
10	213812	05.09.02	RA/HSV1	Z.n. SZT
	232235	10.02.03	RA	
	232244	12.02.03	RA	
11	203144	07.01.03	RA	Z.n. SZT
	284019	07.10.03	RA/HSV1	
	284018	11.11.03	LA	
12	284035	08.12.03	RA	Z.n. SZT bei aplastischer Anämie
	282270	14.04.04	RA	
	232180	03.05.04	RA	
13	268910	01.06.04	RA/HSV1	Z.n. SZT
	268909	19.06.04	RA	
	268913	14.07.04	RA	
	268921	21.07.04	RA	
14	282422	11.06.04	RA/HSV1	Z.n. SZT bei NHL
	264017	14.07.04	RA	
	264030	28.07.04	RA	
	281866	09.08.04	RA	

3.2.1 Gewinnung eines HSV-Lysates

Bei dem zugesandten Untersuchungsmaterial handelt es sich für gewöhnlich um Rachenspülwasser, Abstriche oder Bronchiallavage in einem Transportmedium. Nach Abzentrifugation wird der Überstand verwendet um damit HFF oder Vero-Zellen in Zellröhrchen oder Mikrotiterplatten zu inokulieren. Wenn sich der typische HSV CPE ausgebildet hat, kann man mit 1ml Überstand und 4ml MEM eine große Zellkulturflasche mit einem dichten Zellrasen (HFF oder Vero-Zellen) für 30` inkubieren und anschließend auf 20ml mit MEM (5% FCS) auffüllen. Wenn die Zellen zu 80-100% durchinfiziert sind, führt man die Gefriertanalyse durch. Nach zweimaliger Gefriertanalyse und Abzentrifugieren der Zelltrümmer, werden die Lysate aliquotiert.

Gefriertanalyse:

1. Infizierte Kulturflasche bei -80°C ca. 30 Minuten einfrieren
2. Im Brutschrank ca. 20 Minuten auftauen (Deckel leicht geöffnet)
3. Vorgang wiederholen

Bei 1600 g 5 Minuten abzentrifugieren, aliquotieren (0,6-1ml) und bei -80°C einfrieren.

3.3 Phänotypischer Test

Für alle Titerbestimmungen und phänotypischen Testungen wird MEM mit 5% FCS verwendet.

3.3.1 Zellzählung

1. Vero-Zellen in großer Kulturflasche mit 10ml 1x PBS waschen und mit 5ml Trypsin bedecken
2. 5 Minuten bei 37°C inkubieren, klopfen um alle Zellen zu lösen
3. Zellen in 5ml MEM resuspendieren
4. Bei 260 g 5 Minuten zentrifugieren
5. Überstand abnehmen und Zellen in 10ml Medium resuspendieren
6. Neubauer Kammer vorbereiten (Newtonsche Ringe am Deckglas müssen sichtbar sein)
7. 20 μl der resuspendierten Zellen 1:2 mit Trypanblau verdünnen und davon 10 μl in eine Neubauer-Zählkammer geben

8. Zellen in den 4 Großquadraten zählen und den Mittelwert bilden

9. Berechnung: $n \times 2 \times 10^4 = N$

n = gezählte Zellen (Mittelwert)

2 = Verdünnungsfaktor

10^4 = geometrischer Kammerfaktor

N = Zellen pro ml

In jedem Großquadrat befinden sich 0,1µl Zellsuspension. Der Mittelwert der gezählten Zellen muss daher mit 10^4 (Kammerfaktor) multipliziert werden.

Beispiel:

$n = 40$

$40 \times 2 \times 10^4 = 8 \times 10^5$

Um 2×10^5 Zellen pro ml zu erhalten, muss man die Zellsuspension 1:4 verdünnen.

Bestimmung der Vitalität:

Vitale Zellen = $N_{\text{total}} - N_{\text{gefärbt}} / N_{\text{total}} \times 100$

3.3.2 Bestimmung der Viruskonzentration

3.3.2.1 Die Endpunktmethode - Tissue Culture Infectious Dose 50% (TCID₅₀)

Bestimmung der TCID₅₀ nach Spearman und Kärber

Bei dieser Titerbestimmung handelt es sich um eine Endpunkt-Methode, welche hauptsächlich bei Viren Verwendung findet, die keine zählbaren Plaques bilden. Genau genommen gibt man damit nicht den Titer an, sondern die Verdünnung (Verdünnung = reziproker Virustiter). Ursprünglich gab man die Konzentration einer Viruslösung mit dem LD₅₀ Titrationstest an (Reed und Muench, 1938). Dabei ist der 50%ige Endpunkt die Verdünnung, bei welcher die Hälfte der mit dem Virus beimpften Hühnerembryonen, in einer bestimmten Zeit, verstirbt. Diese Methode wurde für die Zellkultur als TCID₅₀ modifiziert.

Die TCID₅₀ entspricht einem Titer 10^m , folglich ist $\log \text{TCID}_{50} = m$.

Die Berechnung kann nach folgender Formel erfolgen:

$$\log \text{TCID}_{50} = m = x^a - (S q - 0.5)$$

Beispiel:

Virusverdünnung	Anzahl infizierter Kulturansätze
10^{-1}	$8/8 = 1$
10^{-2}	$8/8 = 1$
10^{-3} a	$8/8 = 1$
10^{-4}	$6/8 = 0,75$
10^{-5}	$1/8 = 0,125$
10^{-6} b	$0/8 = 0$

x^a ist die letzte Verdünnungsstufe bei welcher alle Kammern infiziert sind.

$S q$ ist die Summe der Quotienten von a bis b, also von der Verdünnung an, bei welcher noch alle Kulturansätze infiziert sind, bis zu der Stufe, bei welcher keine Infektion mehr stattfand. Die Auswertung basiert auf Ja/Nein-Entscheidungen, also ob ein CPE aufgetreten ist oder nicht. Die Quantität der CPEs innerhalb einer Kammer spielt keine Rolle. Die Genauigkeit des Ergebnisses hängt auch von der Anzahl der Replika ab.

$$\log \text{TCID}_{50} = m = -3 - (1,875 - 0.5) = -4,375$$

Der Titer dieser Viruslösung kann bei Einsatz von 100µl Virus-Inokulum folgendermaßen angegeben werden:

$$10^{-4,375} \text{TCID}_{50} / 100\mu\text{l} = 10^{-5,375} \text{TCID}_{50} / \text{ml}$$

Durchführung der TCID_{50} – Bestimmung:

1. Die Reihen 1-8 einer Mikrotiterplatte mit 96 Kammern werden mit $2 \times 10^4/100\mu\text{l}$ Vero-Zellen pro Kammer vorbereitet. Diese lässt man im Brutschrank 4 Stunden adhärent anwachsen.
2. Eine ganzzahlig logarithmische Verdünnungsreihe zur Basis 10 wird vorbereitet. Davon nimmt man die Verdünnungen 10^{-3} - 10^{-9} . Pro Kammer werden 100µl der entsprechenden Verdünnungen hinzugegeben (achtfache Bestimmung).
3. Nach 1 Stunde Adsorption im Brutschrank gibt man noch einmal je 100µl MEM dazu.

4. Nach 3 Tagen wird die Platte mikroskopisch ausgewertet, wobei die hohen Verdünnungsstufen besonders genau hinsichtlich beginnender HSV-spezifischer CPEs betrachtet werden müssen.

3.3.2.2 Bestimmung des Plaque-Titers - Plaque Forming Units (PFU)

Durchführung

1. Eine Mikrotiterplatte mit 24 Kammern wird am Vorabend mit 1×10^5 Vero-Zellen pro Kammer beschickt.
2. Für die Bestimmung des Plaque-Titers legt man eine ganzzahlig logarithmische Verdünnungsreihe zur Basis 10 an. Davon nimmt man die Verdünnungen 10^{-3} – 10^{-8} und gibt jeweils 0,2ml der entsprechenden Verdünnungsstufe auf jeweils vier Kammern einer 24er Platte.
3. Nach 90 Minuten im Brutschrank ist die Adsorption beendet und das Inokulum kann abgesaugt werden. Danach wird der Zellrasen mit einem viskösem 0,5%igen Methylcellulosemedium bedeckt.
4. Nach 2-3 Tagen werden das Methylcellulosemedium entfernt und die Zellen mit 0,1%igem Kristallviolett in 50%igem Ethanol für 30 Minuten fixiert und gefärbt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS lässt man die Zellen eintrocknen.
5. Für die Berechnung des Plaque-Titers wird nun ermittelt, wie viele PFU im gesamten Volumen waren.

Folgendes Beispiel soll die Berechnung erläutern:

Verwendung von je vier Replika.

Das Gesamtvolumen je Verdünnungsstufe beträgt 0,8ml da eine vierfache Bestimmung vorgenommen wird. Die Berechnung beginnt mit der ersten Verdünnungsstufe in welcher bei 4 von 4 Replika nicht konfluente Plaques vorkommen und bezieht sich immer auf die letzte Verdünnungsstufe in der noch Plaques auftreten. Im folgenden Beispiel sind dies die Verdünnungen 10^{-5} - 10^{-7}

Anzahl Plaques/Volumen der entsprechenden Endverdünnungsstufe

156/0,8ml 10^{-5} entspricht 156/80ml 10^{-7}

12/0,8ml 10^{-6} entspricht 12/8ml 10^{-7}

1/0,8ml 10^{-7}

Insgesamt ergibt das 169 Plaques je 88,8ml der Verdünnung 10^{-7} . Die Umrechnung pro ml ergibt damit $169:88,8 = 1,9$. Der Plaque-Titer beträgt also $1,9 \times 10^7$ PFU/ml.

3.3.2.3 Schätzung des Plaquetiters mit dem Screening-Plaquereduktionstest

Diese einfache und zeitsparende Methode bietet sich an, wenn man ein Isolat nach erfolgtem Screening-Plaquereduktionstest (Kapitel 3.3.4, Seite 46) nachtesten bzw. auf weitere Virostatika-Suszeptibilität untersuchen möchte.

Mit Hilfe der Plaquezahl in der Viruskontrolle kann man den Titer schätzen und verdünnt dann im nachfolgenden Plaquereduktionstest auf 40 PFUs pro Kammer und kann mit einer Vierfachbestimmung arbeiten und genaue IC_{50} -Werte durch anschließende Probit-Transformation ermitteln.

3.3.2.4 Anzahl Viruspartikel im Verhältnis zur Zellzahl - Multiplicity of Infection (m.o.i.)

Unter der m.o.i. versteht man die Proportion der eingesetzten Menge an Virus zu der Anzahl der damit infizierten Zellen pro Kammer.

Die 50%ige inhibitorische Dosis eines Virostatikums in der Zellkultur ist bei Testverfahren die ohne Plaquezählung ausgewertet werden (z.B. Dye-uptake-Assay), stark abhängig von der m.o.i. (Harmenberg et al., 1985b).

3.3.3 Qualitativ-phänotypischer Test zur Bestimmung der 100%igen inhibitorischen Konzentration – CPE-Reduktionstest (CRA)

Die Testmethode erfolgt in Anlehnung an ein publiziertes Verfahren von Birch et al., 1990. Solch ein Verfahren wird allgemein als CPE-Reduktionstest bezeichnet (cytopathic effect reduction assay, CRA).

Durchführung

1. Eine 96er Mikrotiterplatte wird pro Kammer mit 100µl einer Suspension von 2×10^5 /ml Vero-Zellen beschickt.
2. Die Zellen lässt man für 4 Stunden im Brutschrank adhären werden.
3. Der Überstand wird abgesaugt und alle Kammern bis auf die Zellkontrollen und Virostatikakontrollen und Viruswachstumskontrollen, werden mit 100µl der 100 TCID₅₀ des entsprechenden Viruslysates für 1 Stunde im Brutschrank inokuliert. Zell- und Virostatikakontrollen werden mit 100µl MEM inkubiert. Als Viruswachstumskontrollen dienen 1000 TCID₅₀, 100 TCID₅₀ und 10 TCID₅₀. (Diese Rücktitration dient der internen Kontrolle)
4. Von den zu testenden Virostatika werden ganzzahlig logarithmische Verdünnungsreihen zur Basis 2 angelegt. Von jeder Verdünnungsstufe werden je 100µl (vierfache Bestimmung) je Kammer hinzugegeben. In die Virostatikakontrollen wird die höchste Verdünnungsstufe der entsprechenden Substanz gegeben. Die Zellkontrolle wird mit 100µl MEM aufgefüllt, so dass das Endvolumen 200µl pro Kammer beträgt.
5. Nach 2-3 Tagen kann der Test ausgewertet werden. Für die Validität des Tests ist zuerst die Viruskontrolle zu begutachten, wobei die 1000 TCID₅₀ eine totale Zellyse zeigen soll, dies wird im Protokoll mit +++ angegeben. Bei der 100 TCID₅₀ sollte auch der ganze Zellrasen infiziert sein, was mit ++ angegeben wird. Die 10 TCID₅₀ soll mindestens einen CPE pro Kammer vorweisen können, was mit + bezeichnet wird. Die Inhibitorische Konzentration eines Virostatikums ist jene bei welcher kein CPE mehr sichtbar ist. Ein Maß für die Resistenz ist dabei die höhere Konzentration zur Hemmung der Virusreplikation.

Es handelt sich um eine qualitative Auswertung, da keine einzelnen Plaques gezählt werden können. Dies ist durch das Wachstumsverhalten der Herpes Simplex Viren bedingt, die einen schnellen Replikationszyklus und eine Infektion von Zelle zu Zelle, aber auch eine Infektion über in das Kulturmedium sezernierte Viren durchführen.

3.3.4 Screening-Plaquereduktionstest (SPRA)

Das Vorgehen hierbei ist dem herkömmlichen PRA ähnlich, aber durch Verwendung von vier Virusverdünnungen ist eine Titerbestimmung nicht nötig. Der Test ist somit schneller und erlaubt als semiquantitativer Test eine recht sichere Unterscheidung von sensitiven und resistenten Stämmen. Ähnliche Verfahren wurden von verschiedenen Autoren beschrieben (Tebas et al., 1998; Christophers et al., 1998).

Durchführung

1. Eine 24 Kammerplatte wird mit 1×10^5 Vero-Zellen pro Kammer vorbereitet und über nacht im Brutschrank belassen. (Bei Verwendung von nur 6×10^4 Zellen kann die Platte früher ausgewertet werden).
2. Eine ganzzahlig logarithmische Verdünnungsreihe zur Basis 10 wird von dem zu bestimmenden Virusisolat angelegt. Die Verdünnungstufen 10^{-3} bis 10^{-6} werden in den Reihen A – D mit je 0,2 ml aufgetragen und für 90 Minuten im Brutschrank zur Adsorption belassen. Beim Pipettieren mit der höchsten Verdünnung beginnen. Beim Absaugen des Überstandes bitte nicht alle Kammern auf einmal absaugen.
3. In der Zwischenzeit bereitet man die ACV Verdünnungen vor. Das Virostatikum wird mit MEM so verdünnt, dass nach anschließender 1:2 Verdünnung mit 1%iger Methylcellulose die Endkonzentrationen $0,31 \mu\text{M}$, $1,25 \mu\text{M}$, $5 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$ und $20 \mu\text{M}$ vorliegen. Für PFA 31,3, 62,5, 125, 250 und $500 \mu\text{M}$.
4. Nach der Adsorption wird der Überstand abgesaugt und in Reihe A1 – D1 1ml 0,5%iges Methylcellulosemedium ohne ACV aufgetragen

(Viruskontrolle), in den restlichen Reihen die verschiedenen Konzentrationen des Virostatikums.

5. Nach 2-3 Tagen Inkubation (Platte sollte in dieser Zeit möglichst nicht bewegt werden) werden das Methylcellulosemedium entfernt und die Zellen mit 200µl 0,1%igem Kristallviolett (gelöst in 50%igem Ethanol) für 30 Minuten fixiert und gefärbt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS lässt man die Zellen eintrocknen (am besten im Brutschrank mit geöffnetem Deckel etwa 1 Stunde). Dies erlaubt eine leichtere Beurteilung speziell von Plaques am Rand der Kammer.

Auswertung

Ein Ergebnis im SPRA kann nur als Eingrenzung durch Klassen, bedingt durch die angewandte Virostatikakonzentration angegeben werden. Z.B.: $IC_{50} \sim 0,31\mu M$, $0,31 < IC_{50} < 0,62\mu M$ oder $IC_{50} > 5\mu M$ ACV. Bei der Beurteilung muß die Suszeptibilität in allen vier Virusverdünnungsstufen bewertet werden. Ein Isolat wird als sensitiv gegenüber ACV eingestuft, wenn sich bei 5µM in jeder Verdünnungsstufe eine Abnahme des Viruswachstums um mehr als 50 Prozent zeigt. Ein Isolat gilt dagegen als eindeutig resistent, wenn in allen Verdünnungsstufen in Gegenwart von 5µM ACV eine Verminderung der Virusreplikation von weniger als 50 Prozent im Vergleich zur Kontrolle stattfindet. Ausschlaggebend ist am Ende die Virusverdünnung, die in der Viruskontrolle (kein Virostatikum) 20-100 Plaques enthält. Die niedrigen Verdünnungsstufen mit konfluenten Plaques werden rein qualitativ beurteilt und als +++, ++, +, (+) und – angegeben (Abbildung 6, Seite 48) Hierbei ist anzumerken, dass der Titer des Isolats nicht zu vernachlässigen ist. Zuverlässige Ergebnisse sind nur zu erwarten, wenn die Anzucht wie in Kapitel 3.2.1, Seite 40 beschrieben, erfolgt.

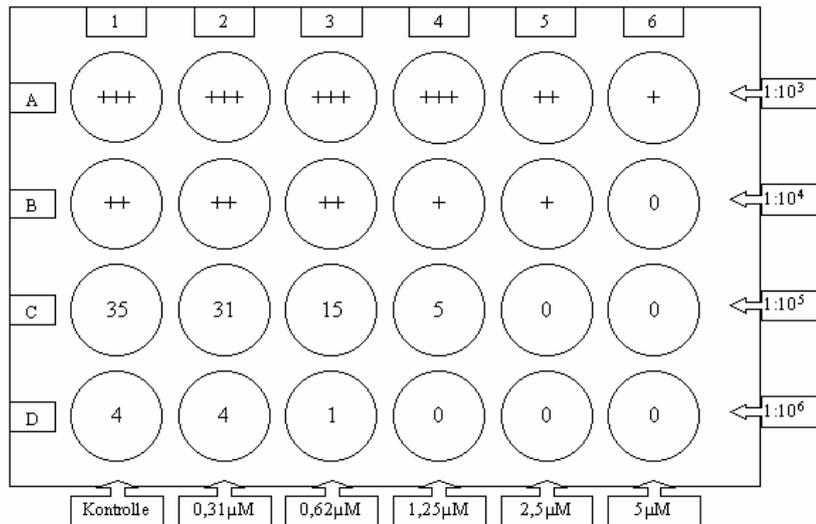


Abbildung 6: Beispiel für die Auswertung einer ACV-Screeningplatte eines sensitiven Isolates. Zählbare Plaques bei Verdünnung 1:10⁵. 0,31 < IC₅₀ < 0,62 μM ACV.

3.3.5 Plaquereduktionstest (PRA) zur Bestimmung der 50%igen inhibitorischen Konzentration - IC₅₀ Bestimmung mittels Probit-Analyse

Vorbereitung der Mikrotiterplatte mit 24 Kammern:

1. Die Platte wird mit 1x10⁵ Vero-Zellen pro Kammer vorbereitet und über nacht im Brutschrank belassen. (Bei 6x10⁴ Zellen kann die Platte früher ausgewertet werden).

Testdurchführung:

1. Man nimmt das gewonnene Viruslysate und verdünnt auf die 100 TCID₅₀/200 μl oder auf PFU 40 wenn man den Plaquetiter aus dem Screening-Plaquereduktionstest geschätzt hat wie in Kapitel 3.3.2.3, Seite 44 beschrieben oder den Plaquetiter genau bestimmt hat, wie in Kapitel 3.3.2.2, Seite 43 beschrieben.
2. Nach dem Abnehmen des Überstands werden die Kammern mit 200 μl der Virusverdünnung des entsprechenden Virusstamms bedeckt. Anschließend 90 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubieren

3. Es werden in der Zwischenzeit die ACV - Verdünnungen vorbereitet. Das Virostatikum wird mit MEM so verdünnt, dass nach anschließender 1:2 Verdünnung mit 1%iger Methylcellulose die Endkonzentrationen 0,31µM, 1,25µM, 5µM, 10µM und 20µM vorliegen. Für PFA 31,3, 62,5, 125, 250 und 500µM. Für CDV 3,12, 6,25, 12,5, 25 und 50µM.
4. Der Überstand wird abgenommen und je 1ml der entsprechenden Verdünnungen werden zugegeben. Die erste Reihe dient als Kontrolle und wird mit 1ml des 0,5%igen Overlay-Mediums ohne Virostatikum bedeckt.
5. Nach 48-72 Stunden Inkubation bei 37°C (Platte sollte möglichst nicht bewegt werden) wird der Überstand abgesaugt und es folgt eine Fixierung und Färbung mit 200µl einer Lösung aus Ethanol 50%ig und 0,1% Kristallviolett für 30 Minuten bei RT.
6. Der Überstand wird abgesaugt und man wäscht mit je 200µl PBS. Vorgang wiederholen und dann die Zellen eintrocknen lassen. Getrocknet kann man die Platten ungekühlt lagern. Die Plaques treten als helle Areale vor einem violetten Hintergrund auf. Plaques von abortiven Infektionen treten als dunkle Areale ohne totale Zellyse auf.

Nach der mikroskopischen Auswertung kann die IC₅₀ -Bestimmung über die Probit-Transformation erfolgen.

Immunperoxidase-Färbung (alternativ)

Hierbei handelt es sich um eine HSV-spezifische Färbung der Plaques mit einem Primärantikörper, der gegen das Membranprotein gB von HSV gerichtet ist, in Kombination mit einem sekundären Kaninchen-anti-Maus Antikörper, der mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist. Dieses Enzym oxidiert den Indikator AEC unter Reduktion von H₂O₂. Das entstehende Präzipitat macht die infizierten Zellen sichtbar.

- Nach der Inkubation werden das Medium abgesaugt und die Zellen für 20 Minuten pro Kammer mit 200µl kaltem Methanol fixiert und permeabilisiert. Anschließend einmal mit PBS gewaschen.

- 100µl des primären und 100µl des sekundären Antikörpers werden in jede Kammer pipettiert und 2 Stunden bei RT inkubiert.
- Nach einmaligem Waschen mit PBS wird der Indikator AEC mit H₂O₂ (1:1000) aufgetragen.

Die Meerrettich-Peroxidase enthält einen Porphyrinring mit dreiwertigem Eisen und kann das Substrat H₂O₂ zu H₂O reduzieren und als Redox-System gleichzeitig den Farbstoff AEC oxidieren. Bei der Oxidation fällt AEC als Azamethinfarbstoff, ein rotbraunes Präzipitat, aus.

- Nach einmaligem Waschen mit PBS kann man die Zellen eintrocknen lassen und auswerten. Die Platte kann bei RT aufbewahrt werden.

3.3.6 Aktivitäts- und Selektivitätstest

Dieser Zytopathogenitätstest ist ein neu entwickelter Test, welcher bei der Suche nach neuen antiviralen Verbindungen Verwendung fand (Kleymann et al., 2002). Anders als bei dem Plaquereduktionstest, bei welchem die Virusreplikation anhand von auftretenden Plaques quantifiziert wird, bestimmt man bei diesem Test die Menge überlebender Zellen. Dadurch ist es möglich, nicht nur einen Wert für die 50%ige inhibitorische Konzentration, sondern auch für die 50%ige zytotoxische Konzentration (CC₅₀) zu erhalten. Der Selektivitätsindex CC₅₀ / IC₅₀ ist ein Maß für die in vitro Verträglichkeit einer antiviralen Substanz. Von besonderer Bedeutung ist bei diesem Test das Mengenverhältnis von Virus zu Zelle. Zuverlässige IC₅₀-Werte erhält man, wenn man zur Inokulation die kleinste infektiöse Einheit einsetzt. Für HSV ist dies moi 0,0025 (Kleymann und Werling, 2004). Nach fünf Tagen Inkubation wird mit Fluoreszein Diazetat die Enzymaktivität der Zellen bestimmt. Fluoreszein Diazetat ist ein Substrat für zellständige Lipasen der Zellen. Da die Enzyme der Zellen in vitro, nach erfolgter Zelllyse, eine Restaktivität von 2 Tagen besitzen, entspricht das am fünften Tag gemessene Fluoreszenzsignal der Vitalität der Zellen am dritten Tag der Inkubation. Bei dem Waschschrift vor der Zugabe von FDA lösen sich nur vollständig lysierte Zellen, welche mit Sicherheit kein Fluoreszenzsignal mehr geben würden. Mit einem Fluoreszenz Plattenleser, welcher bei 485nm anregt und bei 530nm misst, erhält man relative

Fluoreszenz Einheiten (RFU). 100% Zellvitalität entspricht der Zellkontrolle, 0% Zellvitalität entspricht der Viruskontrolle. $(RFU \text{ Testkammer} - RFU \text{ Viruskontrolle}) / (RFU \text{ Zellkontrolle} - RFU \text{ Viruskontrolle}) \times 100 = \text{Antivirale Aktivität (\%)} (= \text{Zellvitalität (\%)})$. Dabei erreichen die Werte der Testkammern einen niedrigeren Wert als die Zellkontrolle, was auf die Gegenwart von Virus und Virostatikum zurückzuführen ist, wodurch eine geringere Zellreplikation stattfindet. Die Berechnung erfolgt in einer Excel[®] Datei. Bestimmt werden die IC₅₀-Werte mit einer nichtlinearen graphischen Darstellung der antiviralen Aktivität gegenüber der Virostatikakonzentration. Wie bei dem SPRA kann auch hier das Ergebnis nur als Eingrenzung von Klassen genannt werden, die durch die eingesetzte Virostatikakonzentration gegeben sind.

Durchführung

Das folgende Beispiel bezieht sich auf die Testung von einer antiviralen Substanz (ACV, achtfache Bestimmung)

Vorbereitung der Mikrotiterplatte mit 96 Kammern:

- 1) In der 1. Reihe werden 150µl MEM vorgelegt. In den Reihen 3-12 je 50µl MEM
- 2) In Reihe 2 A-H je 100µl ACV 1mM. Durch Überpipettieren von je 50µl erhält man die Gradienten für das entsprechende Virostatikum. Bei der letzten Verdünnungsstufe werden pro Kammer 50µl verworfen. Durch das spätere Endvolumen von 200µl erhält man folgende Endkonzentrationen: ACV 250, 125, 62,5, 31,25, 15,6, 7,8, 3,9, 1,9, 0,9 und 0,5µM.
- 3) In den Reihen 2-12 gibt man je 100µl des auf 25 PFU/100µl verdünnten Virusisolates dazu.
- 4) Am Schluß gibt man in alle Kammern je 50µl einer Suspension von Vero-Zellen, die auf 2×10^5 Zellen/ml eingestellt ist.
- 5) Nach der Inkubation von mindestens 5 Tagen im Brutschrank saugt man den Überstand ab und wäscht einmal mit 200µl PBS / Kammer. Wieder absaugen und Zugabe von je 200µl PBS mit 10µg/ml FDA. Nach 45 Minuten bei RT erfolgt die Fluoreszenzmessung bei 485 / 530nm.

- 6) Für die Auswertung muß man die Rohdaten in die vorbereitete Exceldatei, bzw. SigmaPlot® übertragen.

3.4 Generierung von Labormutanten

3.4.1 Selektionierung mittels steigender Virostatika-Konzentration – ACV-Selektion

Jeder Wildtyp ist aus einer Vielzahl von Subpopulationen zusammengesetzt. Der Anteil an a priori ACV-resistenten Subpopulationen wird mit 0,01-0,2% angegeben (Coen et al.,1982). Folgende sensitive Isolate wurden für die Selektionierung ausgewählt: Das Referenzisolat KOS, das sensitive Patientenisolat 177845 und das sequentielle Patientenisolat 182167 von demselben Patienten, welches bereits als ACV-resistent getestet war. Die Isolate wurden immer auf kleinen Kulturschalen mit je etwa 8×10^5 Vero-Zellen propagiert. Die Ausgangskonzentration von ACV betrug bei den beiden sensitiven Isolaten je $1 \mu\text{M}$ und wurde bis $13 \mu\text{M}$ gesteigert. Bei dem ACV-resistenten Isolat betrug die Konzentration die ganze Zeit über $13 \mu\text{M}$. Zwischen jeder Passagierung wurde eine Gefriertanalyse durchgeführt. Von jeder Passage wurden 2 Isolate aufgehoben. So ist es später evtl. möglich exakt zurückzuverfolgen, wann das erste Mal resistenzassoziierte Mutationen innerhalb der TK aufgetreten sind. Das Vorgehen fand in Anlehnung an eine Publikation von Saijo et al. statt (Saijo et al., 2002b). Nach der letzten Passage wurden die Isolate noch einmal auf großen Kulturschalen abermals mit $13 \mu\text{M}$ ACV propagiert. Die so erhaltenen Labormutanten werden folgendermaßen bezeichnet: KOS-M, 177-M und 182-M (Tabelle 8, Seite 53).

Tabelle 8: Verlaufsprotokoll der ACV Selektionierung von drei Isolaten.

Passage/Tag	KOS ACVsens	177845 ACVsens	182167 ACVres
0	1µM	1µM	13µM bis Passage 10
1/3	1µM	1µM	
2/6	1µM	1µM	
3/8	2µM	2µM	
4/9	3µM	3µM	
5/11	4µM	4µM	
6/14	5µM	5µM	
7/16	6µM	6µM	
8/18	8µM	8µM	
9/20	10µM	10µM	
10/23	13µM	13µM	

3.4.2 Generierung einer PFA-resistenten Mutante – PFA-Selektion

Dieses Verfahren unterscheidet sich von der Selektionierung mit steigenden Konzentrationen dadurch, dass die Selektionierung innerhalb einer Passage, in Gegenwart einer geeigneten Virostatikakonzentration, durchgeführt wird. Zwei 96 Kammerplatten wurden mit 2×10^4 Vero-Zellen pro Kammer vorbereitet und mit je 100µl der 100 TCID₅₀ des ACV- und PFA-sensitiv getesteten Patientenisolates 149502 1 Stunde bei 37°C inokuliert. Anschließend wurden pro Kammer 100µl MEM mit 2000µM PFA zugegeben (Endkonzentration 1000µM PFA). Nach 2 Tagen zeigte sich unter diesen Bedingungen in einer Kammer ein CPE mit nahezu 100% Zelllyse. Der Überstand dieser Kammer wurde abgenommen und auf eine große Kulturschale mit Vero-Zellen gegeben und abermals in Gegenwart von 1mM PFA propagiert und nach 2 Tagen der Gefriertanalyse unterzogen. Das gewonnene Isolat wird als 149-M bezeichnet. Ähnliche Vorgehensweisen sind in der Literatur beschrieben (Kleymann et al. 2002; Derse et al., 1982).

3.5 Genotypische Untersuchungen

3.5.1 Immunfluoreszenztest (IFT) zum Nachweis und zur Typisierung von HSV 1 und HSV 2

Durchführung

- Infizierter Zellmonolayer und nicht infizierten Zellmonolayer abschaben und mit Medium in ein Eppendorf-Tube pipettieren
- Zentrifugation für 10 Minuten bei 300g
- Überstand verwerfen und in 1ml PBS resuspendieren und nochmals für 10 Minuten bei 300g zentrifugieren
- Überstand verwerfen und in 200µl PBS resuspendieren
- Je zweimal 25µl der infizierten Zellen und je zweimal 25µl der nichtinfizierten Zellen auf einen Objektträger (teflonbeschichtet) pipettieren und trocknen lassen
- Für 10 Minuten mit Aceton fixieren
- Auf ein Feld mit infizierten und ein Feld mit nichtinfizierten Zellen je 25µl FITC konjugierten monoklonalen anti-HSV-1 Antikörper geben; ebenso mit anti-HSV-2 Antikörper verfahren; positiven Kontrollobjektträger ebenfalls mit HSV-1 und HSV-2 Reagenz beschicken
- Für 30 Minuten bei 37°C in einem Brutschrank inkubieren und anschließend mit PBS waschen
- Auswertung mit dem Fluoreszenzmikroskop

Positive Zellen erscheinen apfelgrün, nicht infizierte Zellen erscheinen rot (Gegenfärbung mit Evans Blue).

3.5.2 Sequenzierung von UL23

DNS-Isolierung

Von einem HSV-Lysat nimmt man 400µl und gibt 40µl 10xTES und 4µl Proteinase K dazu. Bei 56°C lässt man die Proteinase K 2 Stunden verdauen und inaktiviert sie anschließend für 10 Minuten bei 94°C. Man gibt die gleiche Menge Phenol-Chloroform dazu, 10 Sekunden vortexen und zentrifugiert für 5 Minuten bei ca. 13.000 g. Die obere, wässrige Phase abnehmen und gleiche

Menge Chloroform dazu, wieder vortexen und zentrifugieren. Die obere Phase abnehmen, in neues Tube überführen und 1/10 3M Na-Azetat und doppelte Menge gekühltes Ethanol dazugeben. Für 2 Stunden wird die DNS bei 4°C gefällt, anschließend bei 4°C und ca. 23.000 g. zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Pellet für 15 Minuten bei 45°C unter Vakuum zentrifugiert. Das Pellet wird anschließend in 50µl ddH₂O resuspendiert.

Einfache PCR mit Hot-Start

Zu 40µl Master-Mix (50µl 10xPCR Puffer, 1µl Primer sf6 (100pmol) und 1µl Primer sr1 (100pmol), 4µl dNTP-Mix und 334µl ddH₂O) gibt man 5µl MgCl₂ und 5µl Template. Der Cycler wird folgendermaßen programmiert: 5'' 100°C, danach 1µl Taq-Polymerase hinzugeben. 40'' 94°C, 1' 60°C, 40'' 72°C insgesamt 30 Zyklen, terminal 10' 72°C.

Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung der DNS

Durch UV-Adsorption wird die Konzentration und Reinheit der isolierten DNS bestimmt. 2µl DNS werden 1:30 mit ddH₂O verdünnt und die Adsorption bei 230, 260, 280 und 320nm gemessen. Für den PCR-Ansatz wird die DNS auf eine Konzentration von 20ng/µl eingestellt.

Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte werden auf 1%igen Agarosegelen (ethidiumbromidgefärbt) kontrolliert.

- 0,5g Agarose in 50ml 0,5% TBE-Puffer in der Mikrowelle aufkochen
- 1µl Ethidiumbromid (10mg/ml) hinzugeben und das Gel giessen
- Nach Erhärten des Gels 10µl einer Mischung aus 3µl Probenpuffer und 10µl Amplifikat pro Kammer pipettieren
- Als Kontrolle dient eine 250bp Leiter
- Die Elektrophorese erfolgt bei 100 V über 60 Minuten. Die DNS-Fragmente wandern durch ihre negative Ladung in TBE von der Kathode zur Anode.

- Die Banden werden mit einem UV-Transluminator bei 255nm sichtbar gemacht. Das Ethidiumbromid verstärkt die Adsorption des UV-Lichtes.

Reinigung der Amplifikate

Die Reinigung erfolgt mit dem PCR Purification Kit QIAquick nach Herstellerangaben. Das Amplifikat wird in 45µl EB eluiert. Die gereinigte DNS kann man bei -20°C einfrieren oder gleich für die Sequenzierungs-PCR verwenden.

Sequenzierungs-PCR

4 Einzelansätze a

4µl Big Dye

3µl Template

0,5µl Primer (TKpf, TKf 0, TKf 392, TKf 782; (wie beschrieben bei Saijo et al., 1999), alle Primer 100pmol/µl)

2,5µl ddH₂O; jeweils mit 2µl Öl überschichten

25 Zyklen: 96°C 10'', 50°C 5'', 60°C 4'

Ethanol-fällung für die Sequenzierung

- Kurz zentrifugieren, jeweils 90µl ddH₂O hinzugeben und wieder 90µl entnehmen in neues Tube
- 1/10 2M Na-Azetat und 250µl Ethanol 99% und 5µl Dextranblau (2mg/ml) (um die Pellets anzufärben) dazugeben
- Vortexen und 10 Minuten auf Eis kühlen
- 30 Minuten bei RT max. zentrifugieren und den Alkohol abnehmen
- Das Pellet 2 Stunden bei RT trocknen lassen
- Pellet mit 45µl HPLC H₂O resuspendieren und in Sequenzierungstubes geben.
- Im Cycler bei 90°C für 10'' denaturieren, vortexen und zentrifugieren
- Entweder gleich die Sequenzierung anschließen oder bei -20°C einfrieren

Alternativ wurden einige Sequenzierungen bei der Firma AGOWA (Berlin) durchgeführt. Dazu wurden die gereinigten Amplifikate auf eine Konzentration von ca. 40ng/µl eingestellt. Zu jeweils 10µl Template in 1,5ml Eppendorf Tubes wurden 4µl des entsprechenden Primers gegeben (Konzentration 5pmol). Zur Auswertung wurden die Chromatogramme mit dem Programm Chromas[®] durchgesehen und mit der Sequenz des Referenzstammes verglichen. Anschließend wurden die vier Einzelsequenzen pro Isolat in dem DNS-Analyse Programm DNAsis[®] zusammengefügt und die zugehörige Aminosäuresequenz dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 CPE-Reduktionstest

Allgemeines

Der CPE Reduktionstest wurde ursprünglich auf HFF Zellen durchgeführt. Alle Patientenisolat wurden bis Anfang 2003 primär mit dieser Methode untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde von HFF auf Vero-Zellen umgestellt. Diese Isolate wurden erneut angezüchtet und mit diesem Test noch einmal auf Vero-Zellen die Suszeptibilität gegenüber ACV und PFA bestimmt.

Ergebnisse

Die in Tabelle 9, Seite 59 dargestellten Ergebnisse auf Vero-Zellen für ACV fallen meist etwas geringer aus als die primären Werte auf HFF. Alle Isolate die auf HFF als ACVres eingestuft wurden, sind auch auf Vero-Zellen als ACVres zu betrachten. Die größte Abweichung zeigt Isolat 149502 von Patient 3 mit einer 16-fach niedrigeren IC_{100} für ACV im Vergleich zum ursprünglichen Wert. Fast keine Abweichung zeigen die Isolate mit IC_{100} -Werten von 2-4 μ M ACV. Bei PFA zeigt Isolat 169612 die größte Diskrepanz mit einer 2,6-fach höheren Sensitivität auf Vero-Zellen. Ergebnisse auf Vero-Zellen: Isolat 164511 von Patient 1 zeigt zu Isolat 169612 eine 15-fache Abnahme der Suszeptibilität gegenüber ACV (62,5:3,9 μ M ACV). Ähnliche Änderungen der Suszeptibilität zeigen sich auch noch bei Patient 2, 3 und 7. Eine solche Änderung steht für eine ACV-Resistenz. Die Isolate von Patient 5 zeigen von Anfang an einen erhöhten IC_{100} -Wert. Interessant ist die erneute Steigerung der Sensitivität für ACV bei Isolat 147567 und 187035 von Patient 3. Dasselbe ist bei Isolat 203923 von Patient 7 zu sehen. Die Bewertung bei PFA gestaltet sich schwieriger, da nahezu alle Werte oberhalb des Cut-offs für PFA-Resistenz (IC_{50} 330-350 μ M PFA) liegen. Die Isolate 149502 und 147567 haben den höchsten Wert. Hier ist von einer fraglichen PFA-Resistenz auszugehen. Der Zeitliche Verlauf ist in Tabelle 7, Seite 39 zu sehen.

Ergebnisse

Tabelle 9: Ergebnisse des CPE-Reduktionstests auf HFF und Vero-Zellen von zwei Referenzstämmen und 28 Isolaten von 11 Patienten. *Kursiv: ACVres bzw. PFares.*

Patient	Isolat Nr.	ACV		PFA	
		IC ₁₀₀ /HFF	IC ₁₀₀ /Vero	IC ₁₀₀ /HFF	IC ₁₀₀ /Vero
1	169612	<4,5µM	3,9µM	<660µM	250µM
	164511	450µM	62,5µM	660µM	500µM
	170796	>500µM	62,5µM	>500µM	375µM
2	161447	4µM	1,95µM	n.u.	250µM
	143491	>500µM	500µM	n.u.	750µM
3	149502	500µM	31,3µM	n.u.	1000µM
	165264	>500µM	250µM	<500µM	750µM
	147567	n.u.	3,9µM	n.u.	1000µM
	187035	n.u.	1,95µM	n.u.	750µM
4	104224	3,9µM	1,95µM	n.u.	500µM
5	190413	>500µM	62,5µM	<500µM	375µM
	147488	>500µM	62,5µM	n.u.	375µM
	147564	n.u.	62,5µM	n.u.	500µM
	187037	n.u.	62,5µM	n.u.	750µM
	147391	n.u.	62,5µM	n.u.	500µM
6	177015	3,9µM	3,9µM	500µM	500µM
7	177845	2µM	1,95µM	500µM	250µM
	182167	>500µM	250µM	375µM	375µM
	203923	15,6µM	3,9µM	n.u.	500µM
8	182367	<4µM	1,95µM	<500µM	250µM
	196157	<4µM	1,95µM	<500µM	250µM
	196573	n.u.	7,8µM	n.u.	250µM
9	205799	n.u.	1,95µM	n.u.	500µM
	205794	n.u.	3,9µM	n.u.	500µM
10	213812	<2µM	1,95µM	375µM	375µM
	232235	n.u.		n.u.	
	232244	<2µM	1,95µM	375µM	375µM
11	203144	n.u.	3,9µM	n.u.	375µM
KOS		n.u.	3,9 - 7,8µM	n.u.	500µM
Mclntyre		3,9µM	3,9 - 7,8µM	500µM	500µM

4.2 Histochemische und HSV-spezifische Plauefärbung

Allgemeines

Durch die Überlagerung mit Methylcellulose wird die bei HSV übliche Ausbreitung über das Medium verhindert und das Virus kann sich nur von Zelle zu Zelle ausbreiten. Es entstehen für gewöhnlich kreisrunde Plaques, entsprechend dem HSV-spezifischen CPE, mit infizierten und teilweise schon lysierten Zellen. Jeder Plaque ist auf die Infektion einer Zelle mit einem infektiösen Viruspartikel zurückzuführen. Ein Plaque sollte mindestens 10 - 20 Zellen umfassen um gewertet zu werden. Auch leicht konfluente Plaques können noch gewertet werden. Die Plaquegröße ist bei den meisten Patientenisolaten geringer als bei dem Referenzstamm KOS. Die Plaquegröße hängt auch von der Zelldichte ab. Subjektiv schönere Plaques erhält man bei einer geringeren Zelldichte. Die Auswertung muß dann aber unter Umständen früher erfolgen, um konfluente Plaques zu vermeiden. Bei sensitiven Isolaten zeigt sich bei höheren Virostatikakonzentrationen eine Abnahme der Plaquegröße. Man bezeichnet solche Plaques als abortiv, da die initiale Infektion durch das Virostatikum zum Stillstand gekommen ist.

Man kann die Zelldegeneration auch ohne Färbung erkennen (Abbildung 7:, Seite 61). Um Zellen zu färben und damit leichter von nichtinfizierten Zellen unterscheiden zu können, gibt es verschiedene Möglichkeiten. Es wurden eine unspezifische und zwei spezifische Färbungen verglichen. Die histochemische Färbung mit Kristallviolett zeichnet sich durch ihre einfache Durchführbarkeit aus und ist kostengünstig. Die spezifischen anti-gB-Färbungen mit Immunperoxidase, oder Alexa-488, sind arbeitsintensiver als die histochemische Färbung. Kristallviolett (auch Gentianaviolett), ein Anilinfarbstoff, wird zur Färbung von Zellkernen und in der Mikrobiologie für die Gram-Färbung verwendet. In Abbildung 8: sind zwei Plaques des ACV-sensitiven Referenzstammes KOS nach anti-gB-Immunperoxidasefärbung zu sehen. Einmal in Abwesenheit von ACV und einmal in Gegenwart von 5µM ACV. Die Größenabnahme ist typisch für ACV-sensitive HSV-Stämme und ist

auch schon bei geringeren Konzentrationen zu beobachten. In Abbildung 8:, Bild 4, sieht man die gefärbten Zellkerne. Dort sind die Glykoproteine, gegen die der erste Antikörper gerichtet ist, lokalisiert. Bei der Färbung mit Alexa-488 zeigt sich ein ähnliches Bild (Abbildung 9:, Seite 63). Plaques nach Färbung mit Kristallviolett lassen sich genauso gut erkennen wie mit den spezifischen Methoden (Abbildung 10:, Seite 64).

HSV-spezifischer CPE auf HFF und Vero-Zellen

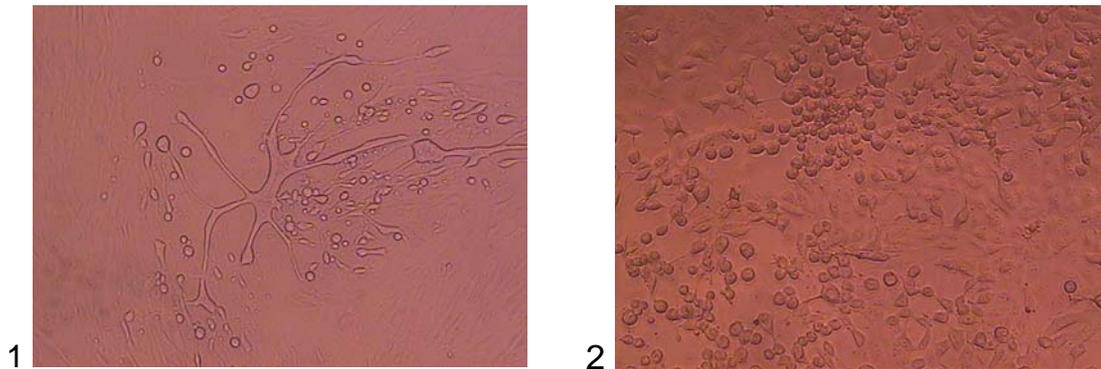


Abbildung 7: CPE auf HFF (Bild 1) und CPE auf Vero (Bild2), jeweils ohne Celluloseüberlagerung entstanden und ungefärbt. Auf Bild 1 ist eine typische Syncytie zu sehen. Vergrößerung 100x.

HSV-1 und HSV-2-spezifische anti-gB-Immunperoxidasefärbung

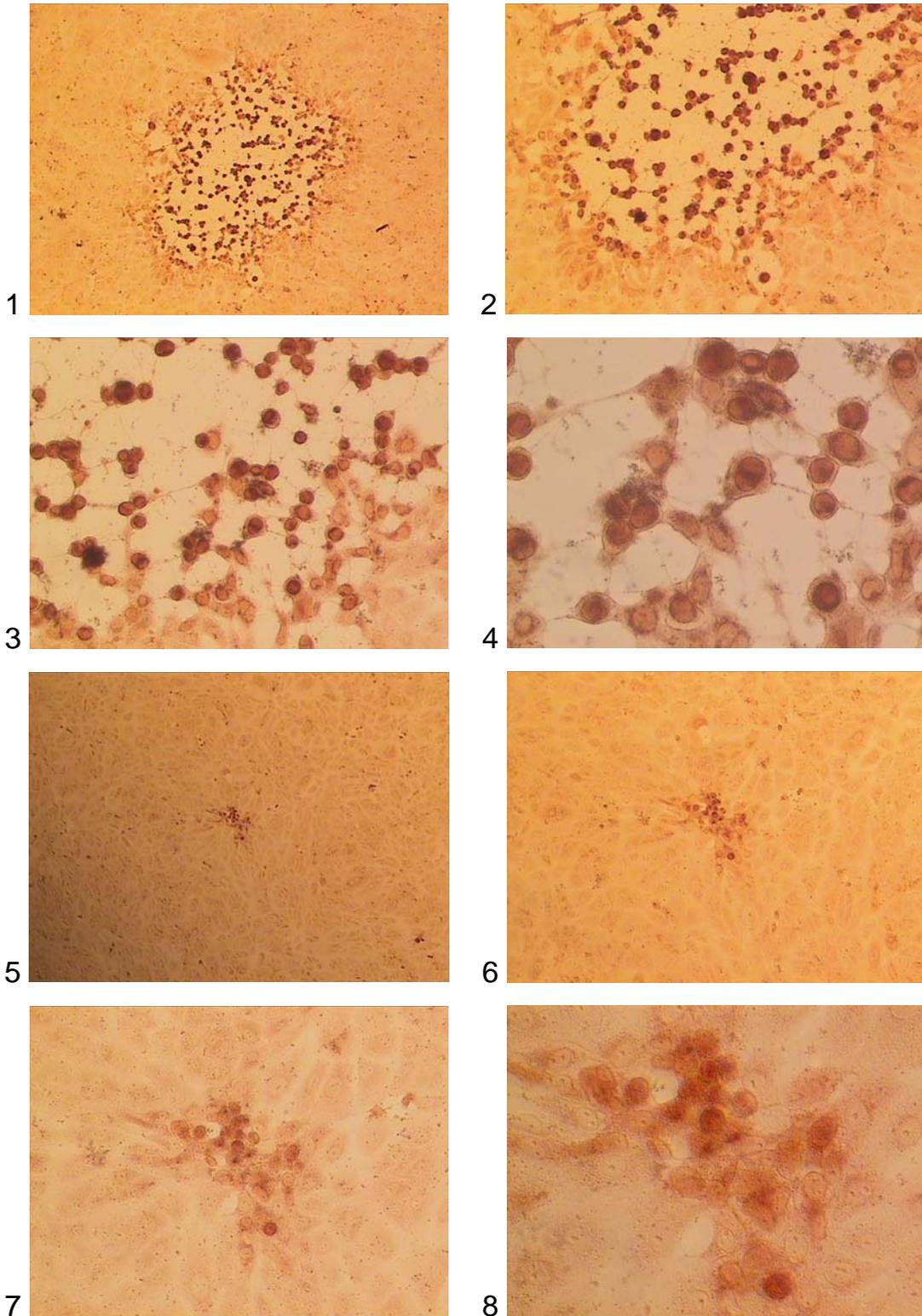


Abbildung 8: Referenzstamm KOS auf Vero-Zellen. Die Bilder 1-4: 0μM ACV. Bilder 5-8: 5μM ACV. Vergrößerung jeweils 50x, 100x, 200x und 400x.

HSV-1 und HSV-2-spezifische anti-gB-Färbung mit Alexa-488 (IFT)

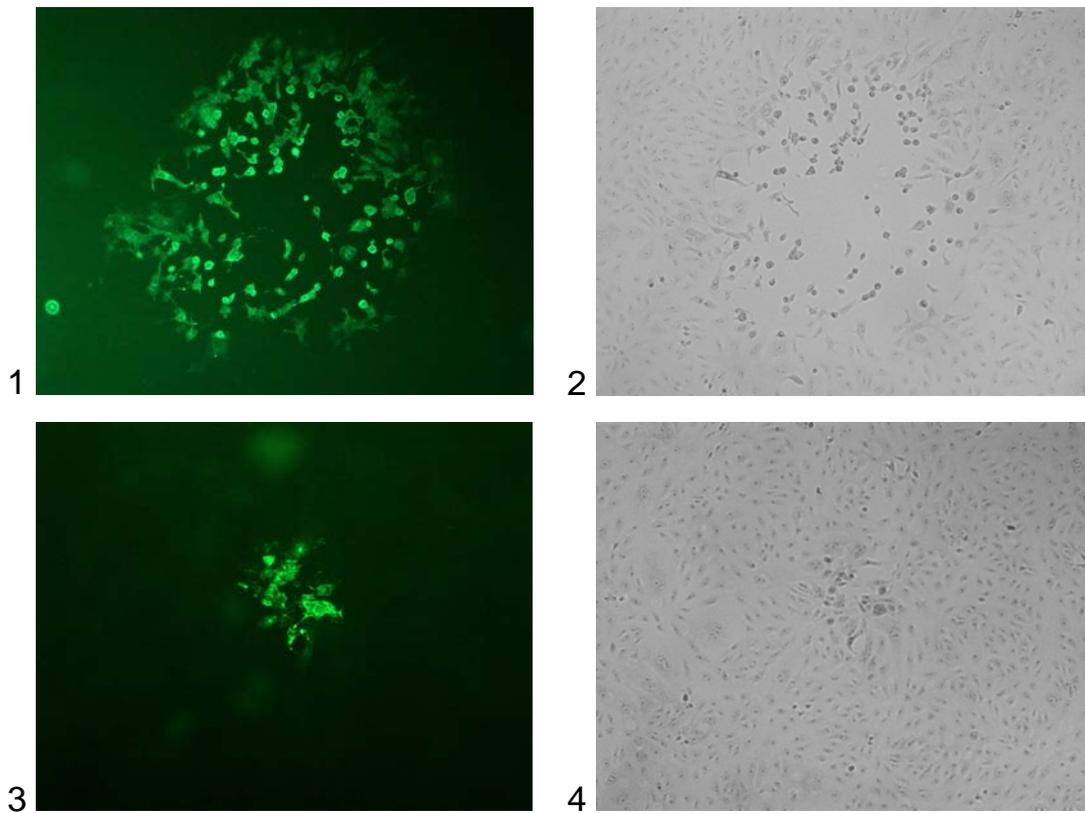


Abbildung 9: Referenzstamm KOS auf Vero-Zellen. Bild 1: 0 μ M ACV. Bild 2 zeigt denselben Plaque in der Nativ-Aufnahme. Bild 3: 5 μ M ACV. Bild 4 zeigt denselben Plaque in der Nativ-Aufnahme. Vergrößerung 100x.

Histochemische Färbung mit Kristallviolett

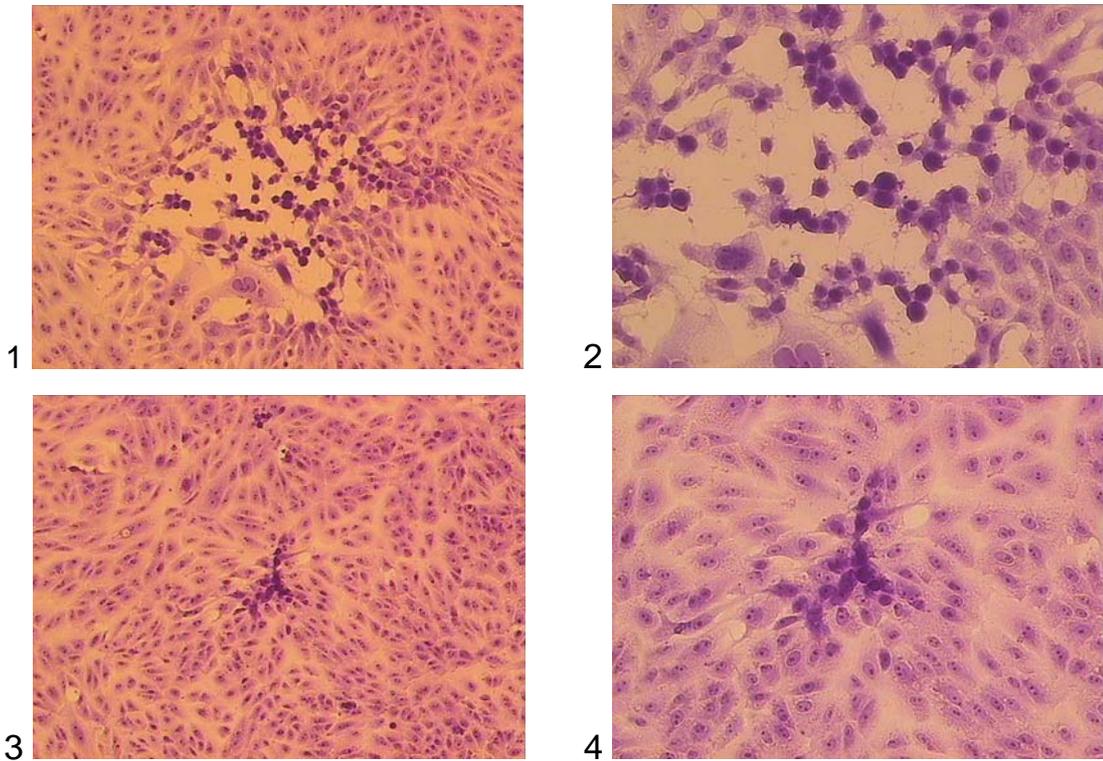


Abbildung 10: Referenzstamm KOS auf Vero-Zellen. Bild 1 und 2: 0μM ACV, 100x und 200x. Bild 3 und 4: 5μM ACV, 100x und 200x.

4.3 Screening-Plaquereduktionstest (SPRA)

Bei einem sensitiven Isolat ist der Zellrasen bei 5 μ M ACV auch bei hoher Viruskonzentration intakt, während bei 0 μ M eine vollständige Zellyse zu sehen ist (Abbildung 11, Seite 65). Bei einem resistenten Isolat ist in keiner Virusverdünnung bei 5 μ M eine Abnahme der Virusvermehrung zu erkennen.

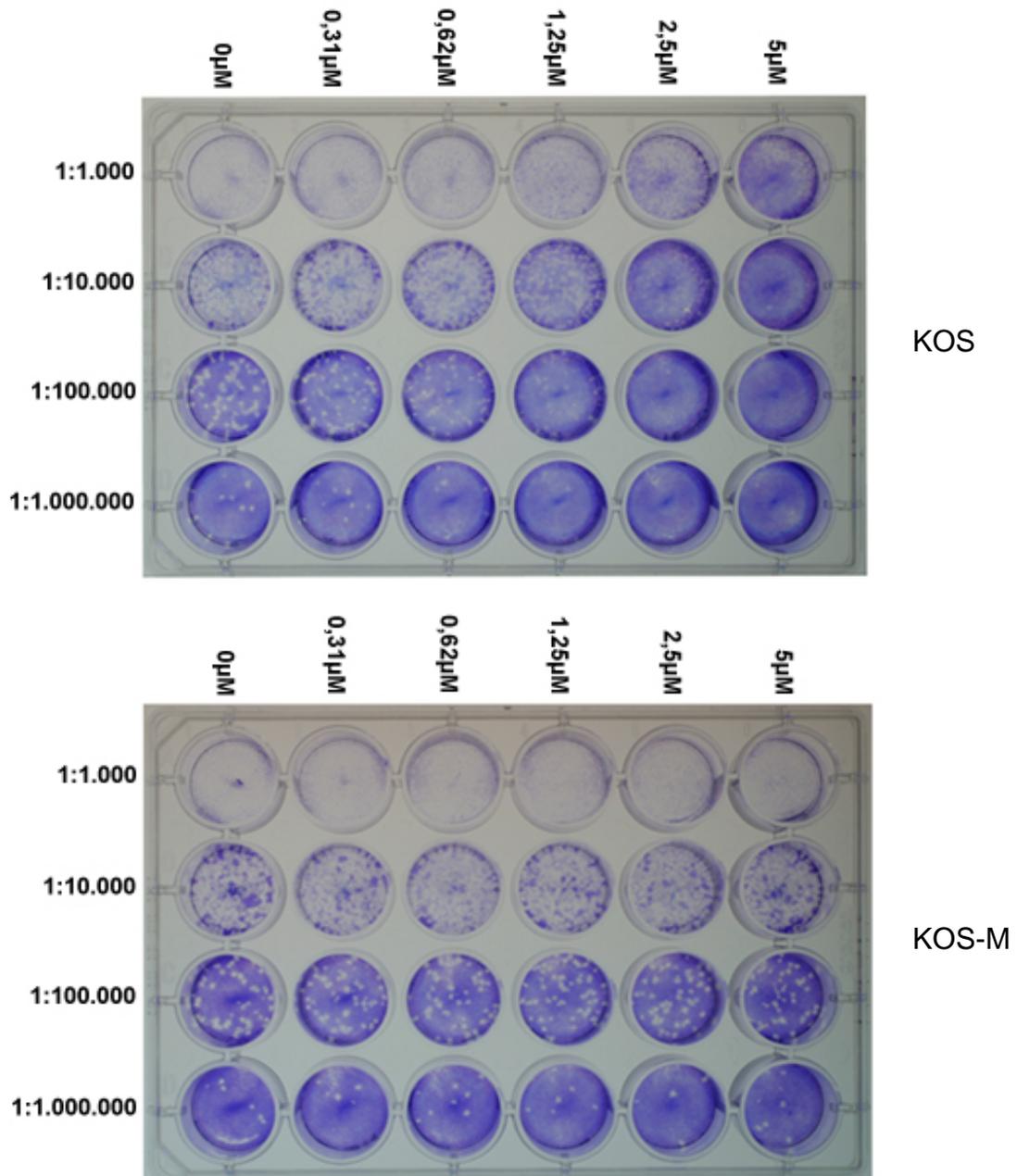


Abbildung 11: ACV-Screeningplatten von Referenzstamm KOS und Laborstamm KOS-M (ACV^{res}) nach Fixierung und Färbung mit Kristallviolett. Zählbare Plaques jeweils bei Verdünnung 1:10⁵ und 1:10⁶.

Ergebnisse SPRA

Der Referenzstamm KOS ist im SPRA eindeutig ACV- und PFA-sensitiv (Tabelle 10, Seite 66). Die ACV-sensitiven Patientenisolat sind im SPRA sensitiver als der Referenzstamm KOS (Tabelle 11, Seite 67). Die Werte liegen zwischen $<0,31$ bis $<2,5\mu\text{M}$ ACV. Das Isolat 268909 von Patient 14 erwies sich mit einer IC_{50} von $>2,5<5\mu\text{M}$ als grenzwertig. Im CPE-Reduktionstest als ACV-resistent eingestufte Isolate der Patienten 1, 2, 3 und 7 wurden mit dem SPRA auch als resistent identifiziert. Alle Patientenisolat wurden im SPRA eindeutig PFA-sensitiv getestet. Die Laborstämme KOS-M, 177-M und 182-M waren ACV-resistent und mit Ausnahme von 182-M ($\text{IC}_{50} \sim 500\mu\text{M}$) PFA-sensitiv. Laborstamm 149-M wurde eindeutig als PFA-resistent identifiziert ($\text{IC}_{50} >500\mu\text{M}$).

Tabelle 10: Virostatika-Suszeptibilität des Referenzstammes KOS im SPRA. In Klammern: Anzahl der durchgeführten Tests.

Screening-Plaquereduktionstest (SPRA)	
KOS	IC_{50} (μM) ACV
	$0,31 < \text{IC}_{50} < 0,62$ (2x)
	$1,25 < \text{IC}_{50} < 2,5$ (4x)
	IC_{50} (μM) PFA
	$125 < \text{IC}_{50} < 250$

Tabelle 11: Virostatika-Suszeptibilität von sequentiellen Patientenisolaten und von den generierten Laborstämmen (siehe auch Tabelle 7, Seite 39)

Screening-Plaquereduktionstest (SPRA)		
Isolat (Patient)	IC ₅₀ (µM)	
	ACV	PFA
169612 (1)	1,25 < IC ₅₀ < 2,5	125 < IC ₅₀ < 250
164511 (1)	IC₅₀ > 5	62 < IC ₅₀ < 125
170796 (1)	IC₅₀ > 5	
161447 (2)	0,31 < IC ₅₀ < 0,62	n.u.
143491 (2)	IC₅₀ > 5	
149502 (3)	n.u.	62,5 < IC ₅₀ < 125
165264 (3)	IC₅₀ > 5	n.u.
177845 (7)	0,31 < IC ₅₀ < 0,62	n.u.
182167 (7)	IC₅₀ > 5	
284019 (12)	0,62 < IC ₅₀ < 1,25	
284018 (12)	IC₅₀ > 5	n.u.
284035 (12)	IC₅₀ > 5	
268910 (14)	IC ₅₀ < 0,31	
268909 (14)	2,5 < IC₅₀ < 5	n.u.
268913 (14)	0,62 < IC ₅₀ < 1,25	
268921 (14)	IC₅₀ > 5	
282422 (15)	IC ₅₀ < 0,31	IC ₅₀ ~ 62,5 µM
264017 (15)	IC₅₀ > 5	n.u.
264030 (15)	IC₅₀ > 5	62,5 < IC ₅₀ < 125
251866 (15)	0,31 < IC ₅₀ < 0,62	31,2 < IC ₅₀ < 62,5
KOS-M (→KOS)	IC₅₀ > 5	n.u.
177-M (→7)	IC₅₀ > 5	n.u.
182-M (→7)	IC₅₀ > 5	IC₅₀ ~ 500
149-M (→3)	n.u.	IC₅₀ > 500

4.4 Plaquereduktionstest (PRA)

Für den verwendeten Referenzstamm KOS findet sich in der Literatur ein mittlerer IC₅₀-Wert, bei der Testung mit einem PRA, für ACV von 0,45 µM (Tebas et al., 1997) und 2,2 µM (Bestman-Smith et al., 2001). Der von manchen Autoren angegebene IC₉₀-Wert ist ein weiteres Maß für Resistenz, unterliegt aber einer größeren Schwankung als der IC₅₀-Wert.

4.4.1 Virostatika-Suszeptibilität Referenzstamm und Patientenisolat

Ergebnisse

Für den Referenzstamm KOS ließ sich eine mittlere IC_{50} von $2,2\mu\text{M}$ ACV bei einer Standardabweichung von $\pm 0,78\mu\text{M}$, ermitteln (Tabelle 12, Seite 68). Der Referenzstamm KOS zeigt somit im PRA einen höheren IC_{50} -Wert als die meisten sensitiven Patientenisolat (Tabelle 13, Seite 69). Er liegt aber deutlich unter dem in der Literatur genannten Cut-off von $3-8,9\mu\text{M}$ ACV. Der höchste ermittelte Wert im CPE-Reduktionstest ist im Vergleich 3,5mal höher als die IC_{50} . Die mit Probit ermittelte IC_{90} für ACV liegt in der Größenordnung der IC_{100} . Während die IC_{100} mit $500\mu\text{M}$ PFA oberhalb des Cut-offs angesiedelt ist, erlaubt die IC_{50} mit $125\mu\text{M}$ eine eindeutige Beurteilung der Sensitivität des Referenzstammes unterhalb des Cut-offs von $330-350\mu\text{M}$ PFA.

Tabelle 12: IC_{50} -, IC_{90} - und IC_{99} -Werte für ACV (4x getestet) und PFA (1x getestet) des Referenzstammes KOS. In der rechten Spalte sind die IC_{100} -Werte, ermittelt mit dem CPE-Reduktionstest (auf Vero-Zellen), zum Vergleich dargestellt. m: Mittelwert, s: Standardabweichung.

	Plaquereduktionstest (PRA)			CPE-Reduktionstest
	ACV IC_{50} (μM)	ACV IC_{90} (μM)	ACV IC_{99} (μM)	ACV IC_{100} (μM)
KOS	1,4	4,4	11,2	3,9-7,8
	1,7	3,6	6,7	
	2,8	7,6	17,8	
	2,95	8,6	21	
	<i>m:2,2; s: $\pm 0,78$</i>	<i>m:6; s: $\pm 2,42$</i>	<i>m:14,2; s: $\pm 6,44$</i>	
	PFA IC_{50} (μM)	PFA IC_{90} (μM)	PFA IC_{99} (μM)	PFA IC_{100} (μM)
	125	274	520	500

Die IC_{50} -Werte der sensitiven Isolate sind mit den Werten aus dem SPRA vergleichbar (Tabelle 11, Seite 67 und Tabelle 13, Seite 69). Isolat 177845 hatte im PRA eine IC_{50} von $0,2\mu\text{M}$ ACV im SPRA $0,31 < IC_{50} < 0,62\mu\text{M}$ ACV. Die mittlere IC_{50} für ACV von $0,9\mu\text{M}$ von Isolat 284019 deckt sich mit dem im SPRA ermittelten Wert von $0,62 < IC_{50} > 1,25\mu\text{M}$. Alle Isolate mit einer $IC_{50} > 5\mu\text{M}$ ACV im SPRA haben im PRA eine IC_{50} oberhalb des oberen Cut-off Wertes von $8,9\mu\text{M}$ ACV. Isolat 182167 mit einer erhöhten IC_{100} zeigt im PRA ACV-Resistenz (Tabelle 13). Die IC_{50} liegt mit $10,2\mu\text{M}$ deutlich über dem Cut-off für

ACV-Resistenz. 177845 und 182167 sind im PRA eindeutig PFA-sensitiv getestet worden. Isolat 149502, das eine gesteigerte IC₁₀₀ von 31,3µM ACV hatte, zeigte im PRA volle Suszeptibilität. Die mit Probit ermittelte IC₉₉ beträgt 31,6µM. Isolat 268909 von Patient 14 war im Screening-PRA (Tabelle 11, Seite 67) durch eine verminderte Suszeptibilität aufgefallen, die sich im PRA mit einer erhöhten IC₅₀ von 6,2µM ACV bestätigte.

Tabelle 13: IC₅₀-, IC₉₀- und IC₉₉-Werte für ACV und PFA verschiedener Patientenisolat (siehe Tabelle 7, Seite 12). In der rechten Spalte sind die IC₁₀₀-Werte, ermittelt mit dem CPE-Reduktionstest (auf Vero-Zellen), zum Vergleich dargestellt. m: Mittelwert, s: Standardabweichung.

Isolat (Patient)	Plaquereduktionstest (PRA)			CPE- Reduktionstest
	ACV IC ₅₀ (µM)	ACV IC ₉₀ (µM)	ACV IC ₉₉ (µM)	ACV IC ₁₀₀ (µM)
149502 (3)	1,35	7,7	31,6	31,3
177845 (7)	0,2	0,8	2,7	1,95
182167 (7)	10,2	1521	(90.000)	250
284019 (12)	0,3 1 1,5 m:0,9; s:±0,6	1,4 5,3 8,1 m:4,9; s:±3,4	5,1 21,2 32,5 n.u.	n.u.
284018 (12)	>20µM	n.u.	n.u.	n.u.
284035 (12)	>20µM	n.u.	n.u.	n.u.
268909 (14)	6,2µM	33µM	130µM	n.u.
264017 (15)	>20µM	n.u.	n.u.	n.u.
	PFA IC ₅₀ (µM)	PFA IC ₉₀ (µM)	PFA IC ₉₉ (µM)	PFA IC ₁₀₀ (µM)
177845 (7)	64	143	278	250
182167 (7)	46	112	229	375
284019 (12)	60 85 m:72,5	218 395	622 1371	n.u.
284018 (12)	253	395	5091	n.u.
284035 (12)	90	796	4675	n.u.

4.4.2 Virostatika-Suszeptibilität der generierten ACV-resistenten Laborstämme

Nachdem die ursprünglich sensitiven Isolate 177-M (Parentalstamm 177845) und KOS-M (Parentalstamm KOS) in Gegenwart von 13µM ACV keine verminderte Replikation zeigten, ist von einer ACV-Resistenz auszugehen. Bei dem

ursprünglich bereits ACV-resistenten Isolat 182-M (Parentalstamm 182167) ist nach 3wöchiger Propagierung in Gegenwart von 13µM ACV ein phänotypisch verändertes ansprechen auf ACV zu erwarten. KOS-M zeigte im PRA einen IC₅₀-Wert von >20µM (Tabelle 14, Seite 70). Damit ist die Sensitivität gegenüber ACV im Vergleich zum Parentalstamm KOS mindestens 10-fach vermindert. 177-M hatte im Vergleich zum Parentalstamm 177845 eine mindestens 100-fache Steigerung des IC₅₀-Wertes für ACV. 182-M erwies ebenfalls einen gestiegenen IC₅₀-Wert für ACV. Alle 3 Laborstämme sind eindeutig hochgradig ACV-resistent. Als einziger Laborstamm zeigte 182-M eine signifikante Steigerung des IC₅₀-Wertes für PFA auf 373µM. Die im SPRA festgestellte PFA-Resistenz (Tabelle 11, Seite 67) wurde mit dem PRA bestätigt. Damit handelt es sich bei 182-M um einen ACV- und auch PFA-resistenten Laborstamm.

Tabelle 14: PRA: Vergleich der Suszeptibilität des Referenzstammes KOS und der ACV-resistenten Mutante KOS-M, sowie der Patientenisolat 177845 und 182167 von Patient 7 mit den zugehörigen Mutanten 177-M und 182-M. (m: Mittelwert)

	KOS	KOS-M	177845	177-M	182167	182-M
ACV IC₅₀	2,2µM (m)	>20µM	0,2µM	>20µM	10,2µM	>20µM
PFA IC₅₀	125µM	112µM	64µM	75µM	46µM	373µM

4.4.3 Virostatika-Suszeptibilität des PFA-resistenten Laborstammes

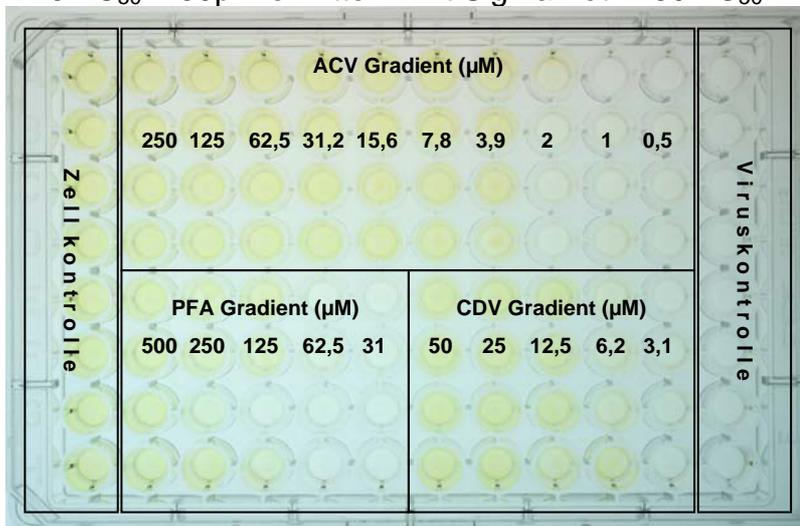
Die PFA-Resistenz des generierten Laborstammes 149-M konnte mit dem PRA bestätigt werden (Tabelle 15, Seite 70). Der Parentalstamm 149502 war ACV-sensitiv und im SPRA PFA-sensitiv (Tabelle 11, Seite 67). Der Laborstamm bewies aber zusätzlich eine geringgradige ACV-Resistenz (Tabelle 15). Der IC₅₀-Wert im Vergleich mit 149502 ist um das 6,6fache angestiegen.

Tabelle 15: PRA: Vergleich der Suszeptibilität des Isolates 149502 von Patient 3 mit der PFA-resistenten Mutante 149-M.

	ACV IC₅₀	ACV IC₉₀	PFA IC₅₀	PFA IC₉₀
149502	1,35µM	7,7µM	n.u.	n.u.
149-M	8,92µM	185µM	755µM	3724µM

4.5 Aktivitäts- und Selektivitätstest (A/S-Test)

Der Fluoreszenzfarbstoff färbt nach 1 bis 2 Stunden auch für das Auge sichtbar die vitalen Zellen an (bzw. Zellen die noch über aktive Enzyme verfügen), während bereits nach 45 Minuten die relativen Fluoreszenzeinheiten mit dem Reader gemessen werden können (Abbildung 12). Die Zellvitalität, bzw. antivirale Aktivität, wurde ursprünglich in einer Excel® Datei mit einer nichtlinearen graphischen Darstellung der antiviralen Aktivität gegenüber der Virostatikakonzentration abgelesen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Auswertung mit dem Computerprogramm SigmaPlot® durchgeführt. Die halblogarithmische Darstellung ermöglicht eine genauere Angabe der IC₅₀ (Abbildung 13, Seite 72; Abbildung 14, Seite 73). Besonders bemerkbar macht sich dies, wenn der IC₅₀-Wert zwischen zwei hohen Virostatikakonzentrationen liegt. In Abbildung 13 kann man den Wert für ACV mit $2 < IC_{50} < 3,9 \mu M$ in der Darstellung mit Excel® angeben. Mit SigmaPlot® $2 < IC_{50} < 2,5 \mu M$ ACV. In Abbildung 14 kann man den Wert für PFA in der Darstellung mit Excel® mit $125 < IC_{50} < 250 \mu M$ ermitteln. Mit SigmaPlot® $150 < IC_{50} < 200 \mu M$ PFA.



7727	6577	9064	7889	7919	7913	7837	7556	2127	3	0	0
8682	8298	8649	8933	8856	9177	9204	7492	510	739	583	0
8463	8359	8634	8496	8093	8637	8936	8988	928	592	571	0
8478	8707	8969	8722	7810	7831	8728	7233	360	1633	366	0
8350	8209	6784	7758	256	0	9363	9229	8252	2133	58	0
8512	8124	5771	6406	1285	235	9632	9525	8911	2091	790	0
8469	7834	2051	412	323	171	10062	9421	8197	3070	745	15
8161	6662	7474	3467	217	266	9177	9210	5506	7639	531	40

Abbildung 12: Testplatte nach der Auswertung mit dem Fluoreszenzreader und die gemessenen relativen Fluoreszenzeinheiten (Isolat 284019, sensitiv).

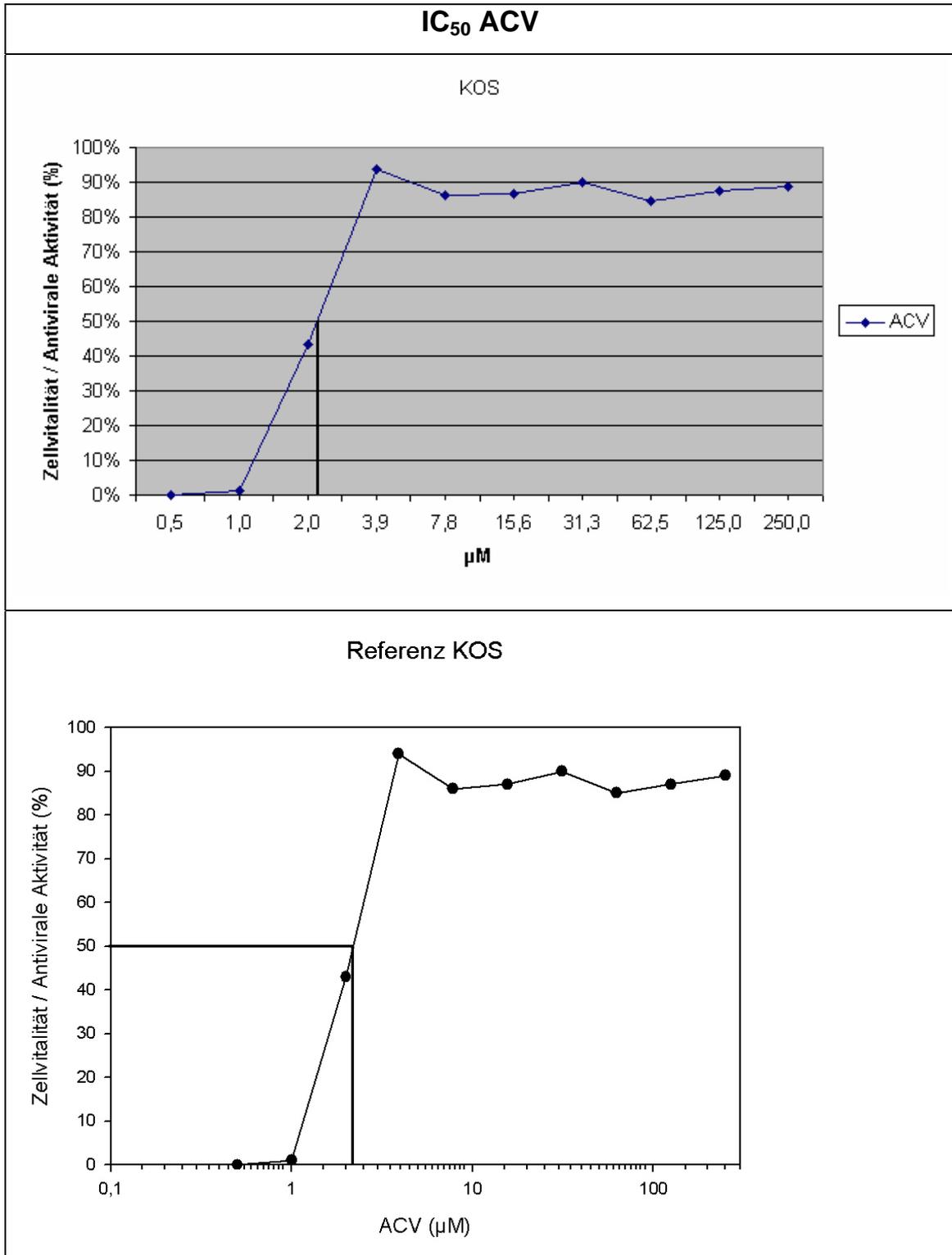


Abbildung 13: Graphische Auswertung der IC₅₀ für ACV mit Excel[®] und SigmaPlot[®].

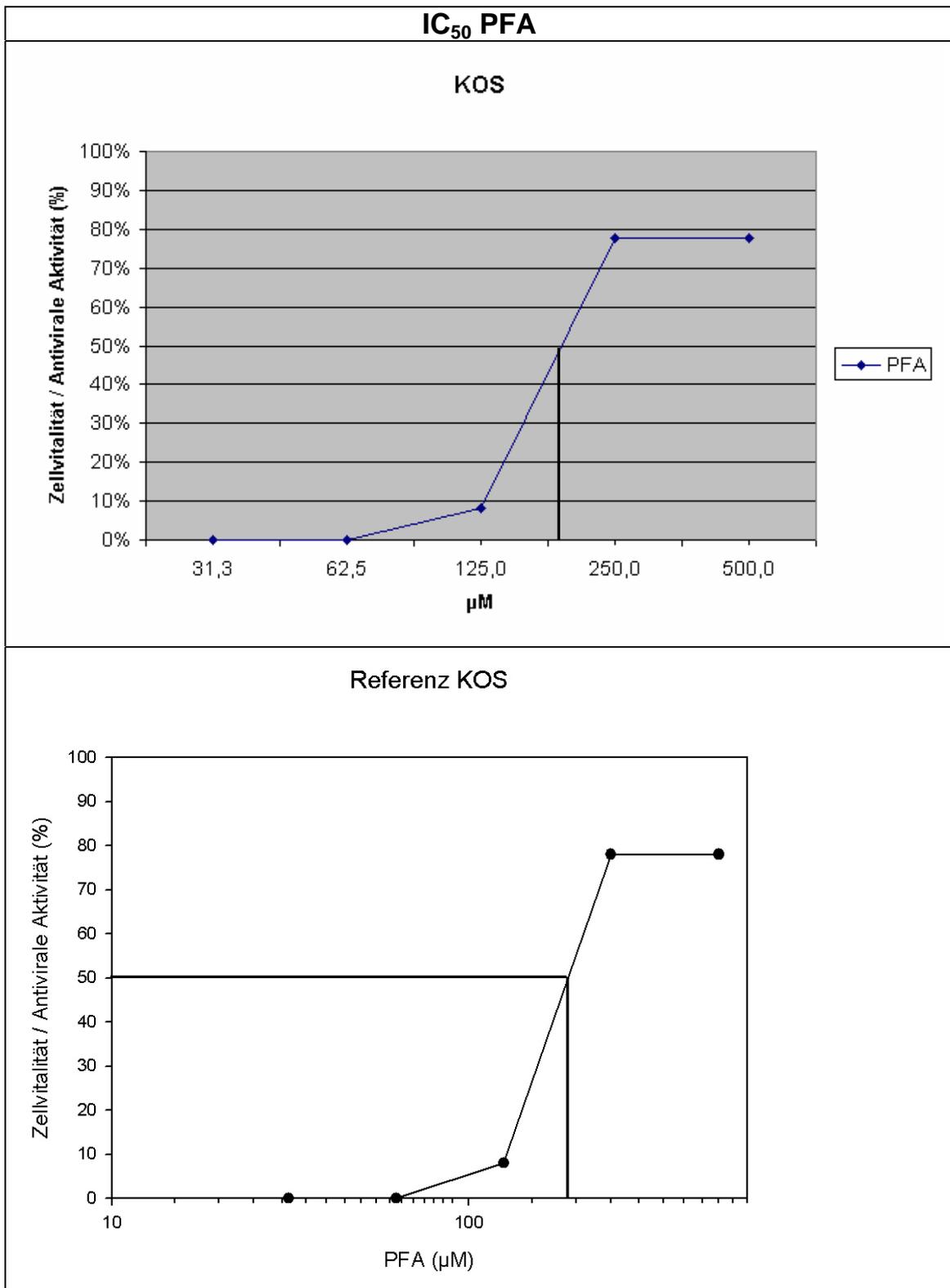


Abbildung 14: Graphische Auswertung der IC₅₀ für PFA mit Excel® und Sigma Plot®.

Ergebnisse

Auf ihre Suszeptibilität wurden sieben Patientenisolat und der Referenzstamm KOS untersucht. Einige Isolate wurde zweimal, KOS viermal getestet (Tabelle 16). Alle getesteten Isolate, die mit anderen Testverfahren als sensitiv bzw. resistent eingestuft wurden (Tabelle 9, Seite 59; Tabelle 10, Seite 66; Tabelle 11, Seite 67; Tabelle 12, Seite 68; Tabelle 13, Seite 69), wurden mit dem A/S-Test ebenfalls so eingestuft. Auffallend ist das stärkere Ansprechen der ACV-resistenten Isolate auf CDV (Tabelle 16). Laborstamm KOS-M ist eindeutig ACV-resistent. Das Ergebnis von 149-M im PRA (Tabelle 15, Seite 70) wurde mit dem A/S-Test bestätigt.

Tabelle 16: A/S-Test. Virostatika-Suszeptibilität von sequentiellen Isolaten und Referenzstamm KOS. Resistenzen durch Kursivdruck hervorgehoben.

Patient	Isolat	ACV	PFA	CDV
KOS	Referenzstamm	2 < IC_{50} < 2,5	n.u.	n.u.
		IC_{50} ~2,5	150 < IC_{50} < 200	10 < IC_{50} < 15
		1,5 < IC_{50} < 2	n.u.	n.u.
		IC_{50} ~2	200 < IC_{50} < 250	15 < IC_{50} < 20
2	161447	IC_{50} < 0,5	n.u.	n.u.
	143491	30 < IC_{50} < 35 35 < IC_{50} < 40	n.u. n.u.	n.u. n.u.
7	177845	IC_{50} ~0,6	50 < IC_{50} < 55	4 < IC_{50} < 4,5
	182167	25 < IC_{50} < 30	IC_{50} ~75	IC_{50} < 3,12
12	284019	2,5 < IC_{50} < 3	100 < IC_{50} < 125	6,5 < IC_{50} < 7
		2,5 < IC_{50} < 3	100 < IC_{50} < 125	9 < IC_{50} < 10
	284018	150 < IC_{50} < 200	200 < IC_{50} < 250	IC_{50} < 3,12
	284035	IC_{50} ~200 50 < IC_{50} < 55	250 < IC_{50} < 300 150 < IC_{50} < 200	3,12 < IC_{50} < 3,5 IC_{50} ~3,12
KOS-M	Laborstamm (ACV-Selektion)	150 < IC_{50} < 200	n.u.	n.u.
		IC_{50} ~150	n.u.	n.u.
		150 < IC_{50} < 200	n.u.	n.u.
		100 < IC_{50} < 150	n.u.	n.u.
149-M	Laborstamm (PFA-Selektion)	IC_{50} ~10	IC_{50} > 500	n.u.

Zusammenfassung der Ergebnisse der 4 phänotypischen Testsysteme

Es konnte gezeigt werden, dass die Beurteilung bezüglich sensitiv / resistent mit allen 4 Testmethoden zuverlässig möglich ist. Bei grenzwertigen Isolaten und bei PFA war der verwendete CRA jedoch den quantitativen Methoden unterlegen.

Tabelle 17: Übersicht der Ergebnisse von Patientenisolaten, die mit mindestens 2 der 4 Testmethoden untersucht wurden, sowie von KOS (S: sensitiv; R: resistent; n.u.: nicht untersucht).

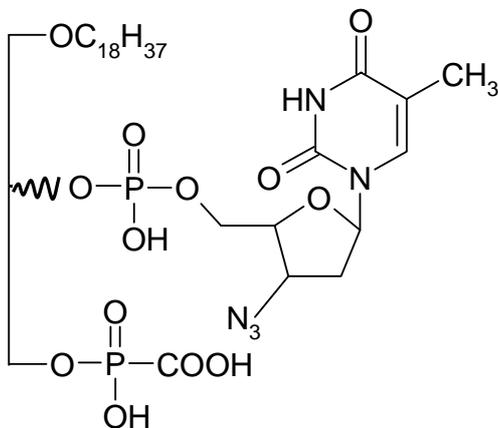
Patient	Isolat	CRA ACV/PFA	SPRA ACV/PFA	PRA ACV/PFA	A/S-Test ACV/PFA
1	169612	S/S	S/S	n.u./n.u.	n.u./n.u.
	164511	R/S	R/S	n.u./n.u.	n.u./n.u.
	170796	R/S	R/n.u.	n.u./n.u.	n.u./n.u.
2	161447	S/S	S/n.u.	n.u./n.u.	S/n.u.
	143491	R/S	R/n.u.	n.u./n.u.	R/n.u.
3	149502	R/(R)	n.u./S	S/n.u.	n.u./n.u.
	165264	R/S	R/n.u.	n.u./n.u.	n.u./n.u.
7	177845	S/S	S/n.u.	S/S	S/S
	182167	R/S	R/n.u.	R/S	R/S
12	284019	n.u./n.u.	S/n.u.	S/S	S/S
	284018	n.u./n.u.	R/n.u.	R/S	R/S
	284035	n.u./n.u.	R/n.u.	R/S	R/S
14	268909	n.u./n.u.	R/n.u.	R/n.u.	n.u./n.u.
15	264017	n.u./n.u.	R/n.u.	R/n.u.	n.u./n.u.
KOS	Referenz	S/S	S/S	S/S	S/S

4.6 Untersuchung antiviraler Wirksamkeit mit dem Aktivitäts- und Selektivitätstest

Der Aktivitäts- und Selektivitätstest eignet sich besonders gut für die Untersuchung neuer antiviraler Substanzen. Ein Grund ist die Gleichzeitige Bestimmung von IC_{50} und CC_{50} . Der andere Grund ist die schnelle halbautomatische Auswertung durch den Fluoreszenzreader. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine neue Substanzklasse (N3) untersucht, die bereits erfolgreich auf ihre in vitro Wirkung gegen CMV und HIV getestet wurde. Zudem wurde die Wirksamkeit des neu entwickelten Helicase-Primase Inhibitors BAY 57-1293 (Kleyman et al., 2002) an Patientenisolaten untersucht.

4.6.1 Wirkung neuer antiviraler Substanzen in vitro

4.6.2 Amphiphiles Nucleosid-Phosphono-Ameisensäurederivat (N3)



AZT-L_{bat}-FosOH

3`-Azido-2`,3`-dideoxy-thymidylyl-(5`-2)-1-O-Octadecyl-rac-glycerol-3-(hydrooxycarbonyl)-Phosphonat

Molekulargewicht : 781,34

Bei N3 handelt es sich um eine Kombination aus Azidothymidin (AZT, einem Reversetranskriptase-Inhibitor), Phosphonoämeisensäure (PFA) und einem Fettsäurerest. Mit dem PFA konnte ein IC_{50} -Wert für den

Referenzstamm KOS von $5,9\mu\text{M}$ N3 mit Probit errechnet werden. Für den ACV-resistenten Laborstamm KOS-M ergab die Probit-Transformation des PRA $5,2\mu\text{M}$ N3. Aus Versuchen mit CMV war bekannt, dass N3 bei $50\text{-}100\mu\text{M}$ auf HFF zytotoxisch wirkt. Mit dem A/S-Test wurde in je 3 Versuchen die IC_{50} für KOS und KOS-M mit $>6,5 - \approx 10\mu\text{M}$ N3 bestimmt. Die CC_{50} lag bei diesen 6 Versuchen zwischen $>35 - <45\mu\text{M}$ N3 (Abbildung 15, Seite 77 und Tabelle 18, Seite 78). Der Selektivitätsindex von N3 für KOS und KOS-M ergab somit 5 - 7. N3 wurde auch gegen vier sequentielle Patientenisolat von zwei Patienten getestet: Isolate 161447 ACVsens und 143491 ACVres (Patient 2) und 177845 ACVsens und 182167res (Patient 7). N3 bewies bei allen vier Isolaten eine ähnliche Wirksamkeit zwischen $0,5 < \text{IC}_{50} < 2\mu\text{M}$ N3 (Abbildung 16, Seite 78 und Tabelle 18, Seite 78). Durch die stärkere Wirkung bei den Patientenisolaten ergab sich auch ein größerer Selektivitätsindex von bis zu ca. 80 (177845).

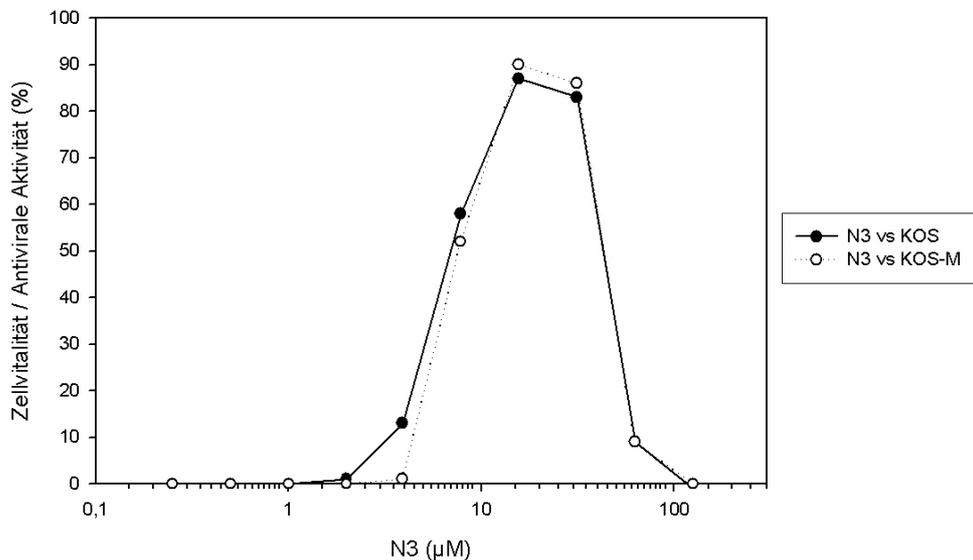


Abbildung 15: Antivirale Wirkung von N3 gegenüber KOS und KOS-M (ACVres).

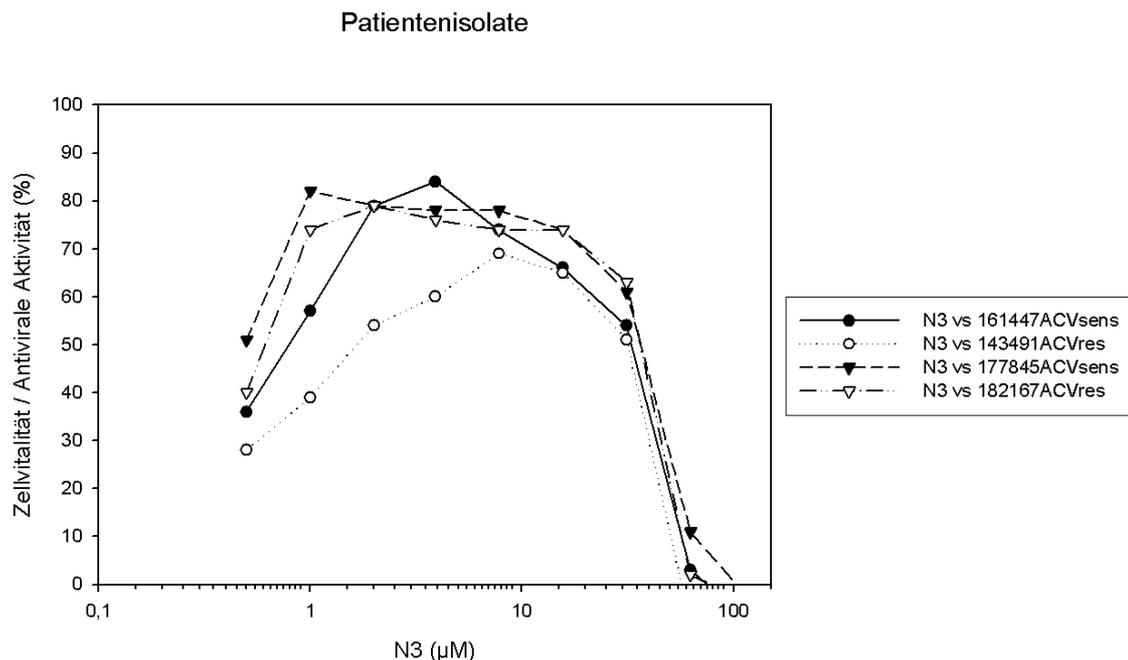


Abbildung 16: Antivirale Wirkung von N3 bei ACVsens und ACVres Patientenisolaten.

Tabelle 18: IC₅₀ und CC₅₀ von N3. Einzelwerte.

HSV	IC ₅₀ µM	CC ₅₀ µM
KOS	6,5 < IC ₅₀ < 7	40 < IC ₅₀ < 45
	8 < IC ₅₀ < 8,5	35 < IC ₅₀ < 40
	8,5 < IC ₅₀ < 9	35 < IC ₅₀ < 40
KOS-M	IC ₅₀ ≈ 7,5	IC ₅₀ ≈ 45
	IC ₅₀ ≈ 10	40 < IC ₅₀ < 45
	IC ₅₀ ≈ 10	40 < IC ₅₀ < 45
161447	0,8 < IC ₅₀ < 0,85	30 < IC ₅₀ < 35
143491	1,5 < IC ₅₀ < 2	30 < IC ₅₀ < 35
177845	IC ₅₀ < 0,5	35 < IC ₅₀ < 40
182167	0,6 < IC ₅₀ < 0,65	35 < IC ₅₀ < 40

Die alleinige Toxizität von N3 auf HFF ergab für die CC₅₀ ~75µM. Das ermittelte Fluoreszenzsignal, bei Abwesenheit von Virus, ergab bis 40µM Werte um 100% (Abbildung 17).

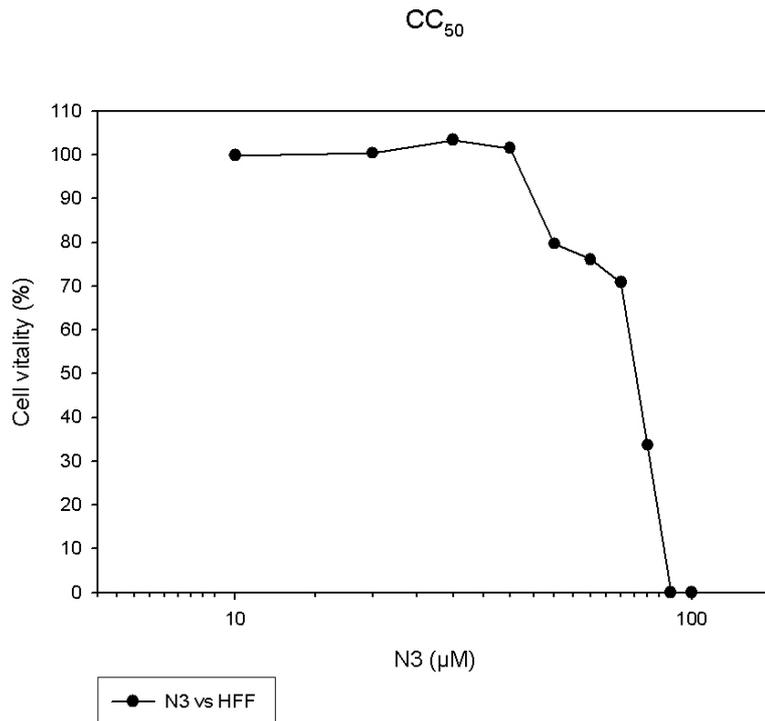
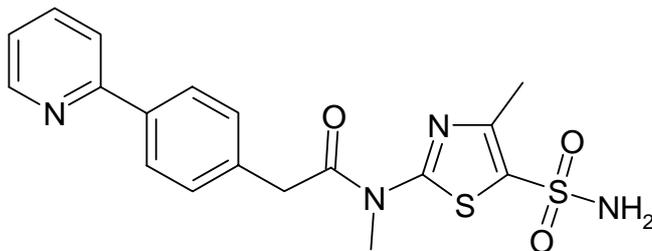


Abbildung 17: Toxizität von N3 auf HFF in Abwesenheit von Virus. $CC_{50} \sim 75 \mu M$ N3.

4.6.3 BAY 57-1293



Thiazolylamid

Molekulargewicht: 402,5

Die Wirkung beruht auf der Bindung an den Helicase-Primase-Komplex (U_L5, U_L8, U_L52) von HSV-1 und HSV-2. Dadurch wird die Replikation verhindert. Eine mittlere IC_{50} von 20nm wird in der Literatur genannt (Kleymann et al., 2002).

Für das ACV-sensitive Isolat 161447 wurde eine IC_{50} von 4nM und das ACV-resistente 143491 $>3,5<4nM$ ermittelt (Abbildung 18).

161447 ACVsens und 143491 ACVres

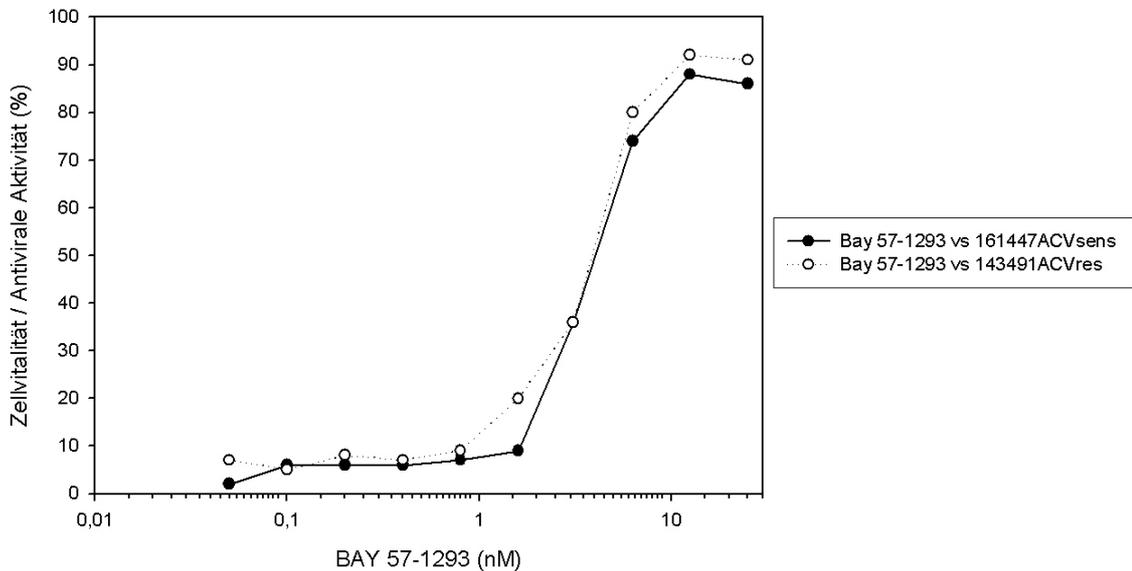


Abbildung 18: Antivirale Wirkung von Bay 57-1293 bei ACVsens und ACVres HSV.

4.7 Genotypische Untersuchungen

4.7.1 Typisierung

Von jedem Patient wurde ein Isolat typisiert. Bei sequentiellen Isolaten wurde stellvertretend nur eins bestimmt. Von den 15 Patienten haben alle HSV-1 ausgeschieden.

4.7.2 UL23 PCR

Von allen untersuchten Labor- und Referenzstämmen und Patientenisolaten ließ sich die UL23 Region amplifizieren.

4.8 Sequenzierung

Um die Ursache der Aciclovir-Resistenz auf molekularbiologischer Ebene darzustellen wurde der Genabschnitt UL23 von verschiedenen phänotypisch ACV-sensitiven und ACV-resistenten Stämmen sequenziert. Sequenziert wurden der Referenzstamm KOS und der ACV-resistente Laborstamm KOS-M. Die beiden Patientenisolate 177845 ACVsens und 182167 ACVres von Patient 7 und die filial Laborstämme 177-M und 182-M (ACVres und PFAres). 161447 ACVsens und 143491 ACVres von Patient 2 und die drei Isolate von Patient 12. Der Vergleich mit der publizierten Aminosäuresequenz des Referenzstammes KOS mit der Sequenz des verwendeten Referenzstammes ergab, dass im Codon 367 anstatt für Methionin für Threonin kodiert wird. Bei dem Laborstamm KOS-M fand sich eine Addition von Guanin in einem homopolymeren 7-G-Abschnitt in Position 430. Dieselbe Mutation fand sich auch bei dem Laborstamm 182-M (Abbildung 19, Seite 82). Diese Mutation führt zu einer komplett anderen Aminosäuresequenz ab Codon 146 und einem vorzeitigen Stopcodon. Bei dem generierten Laborstamm 177-M war die einzige Abweichung, im Vergleich mit dem Parentalstamm 177845, eine Aminosäuresubstitution. Arginin ist im Codon 216 durch Cystein ersetzt (R216C) (Abbildung 20, Seite 83). Bei den generierten Laborstämmen 177-M und 182-M war im Vergleich mit KOS eine stumme Mutation in Nukleotidposition 694, die auch bei dem Patientenisolat 177845 vorkam. Bei den Isolaten 161447 und 143491 war in Codon 118 Alanin durch Valin ersetzt und eine stumme Mutation in Nukleotidposition 694. Isolat 143491 hatte in Nukleotidposition 548 eine Addition von Cytosin, die ab Codon 185 zu einer veränderten Aminosäuresequenz mit vorzeitigem Stopcodon führt (Abbildung 21, Seite 83). Alle drei Isolate von Patient 12, 284019, 284018, 284035, hatten zwei stumme Mutationen. Einmal in Nukleotidposition 171 und einmal in Nukleotidposition 694. Alle drei hatten in Codon 42 für die Aminosäure Prolin codiert. KOS codiert an dieser Stelle für Leucin. In Codon 89 codierten alle drei für Arginin. KOS codiert hier für Glutamin. Die Isolate 284018 und 284035 hatten zusätzlich eine Aminosäuresubstitution in Codon 200. Glycin war durch

Aspartat ersetzt (Abbildung 21, Seite 83). Alle sequenzierten Isolate hatten in Codon 367 den Austausch von Methionin durch Threonin.

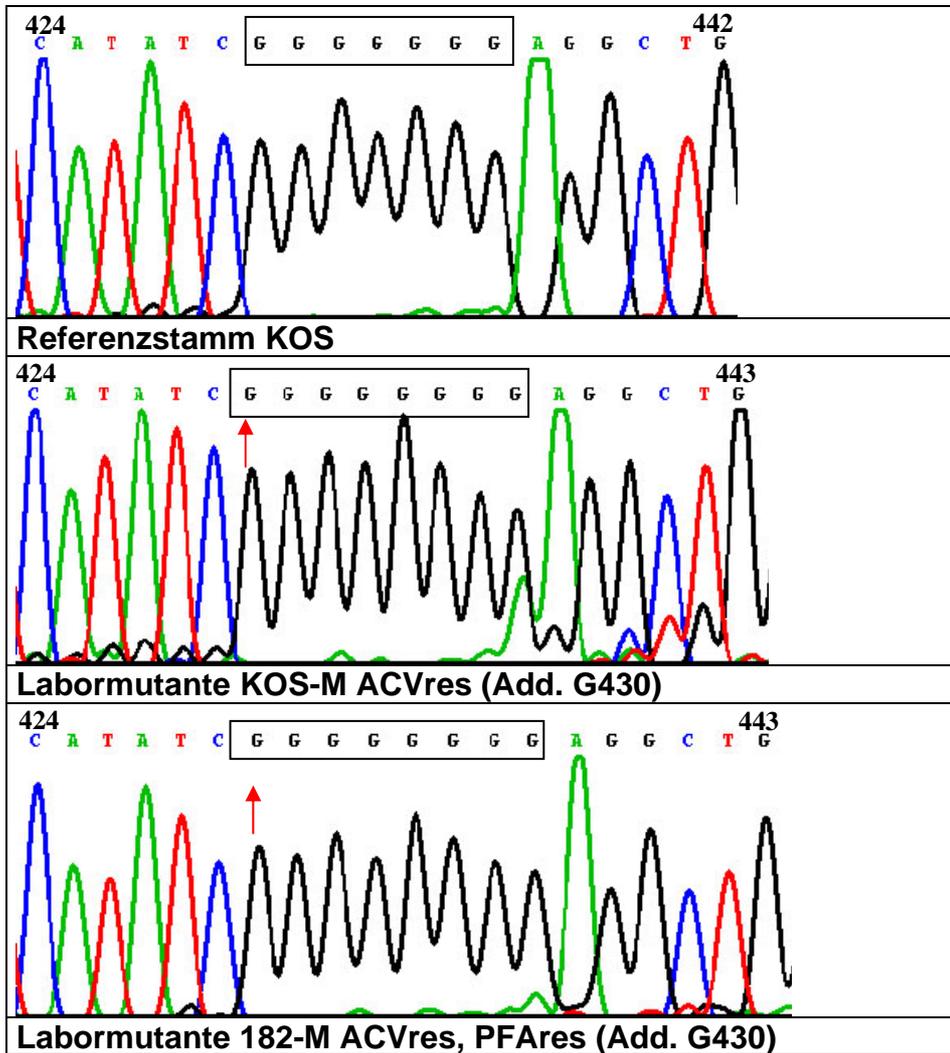


Abbildung 19: Ausschnitt aus den Chromatogrammen der UL23 Sequenzierung von KOS, KOS-M und 182-M. Bei KOS-M und 182-M ist innerhalb des homopolymeren G7-Abschnitts bei Nukleotidposition 430 ein zusätzliches Guanin eingefügt.

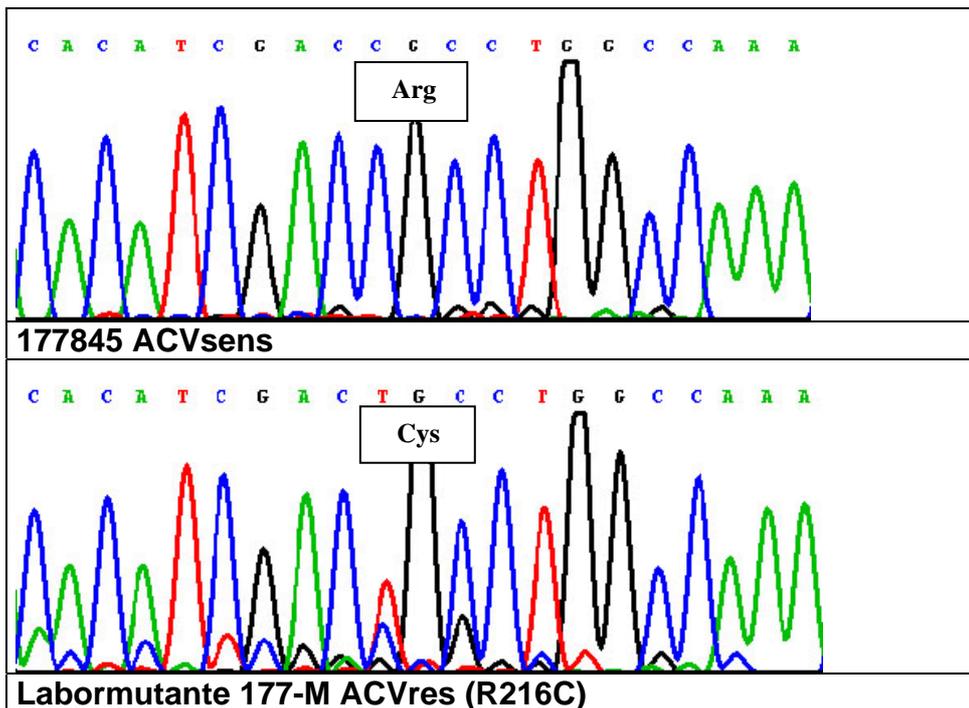


Abbildung 20: Chromatogramme der UL23 Sequenzierung von 177845 (Patient 7) und 177-M, Codon 213-219. Durch Substitution von Cytosin durch Thymin kodiert Codon 216 bei der Labormutante 177-M für Cystein.

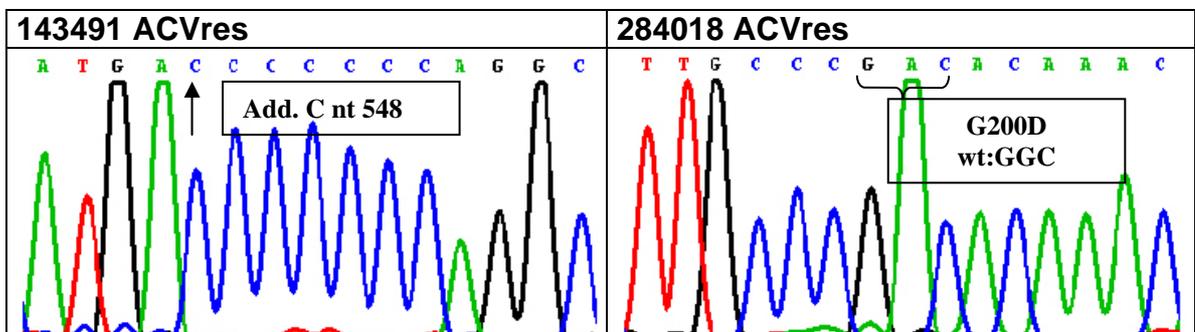


Abbildung 21: Ausschnitte aus den Chromatogrammen der UL23 Sequenzierung von 143491 ACVres (Patient 7; Add. C nt 548) und 284018 ACVres (Patient 12; G200D).

Tabelle 19: Mutationen innerhalb von UL23 der untersuchten Stämme. as: Aminosäure; nt: Nukleotid; add: Addition. *nach der Frameshiftmutation sind alle Nukleotide um eine Position versetzt, aber die Nukleotidabfolge entspricht den Parentalstämmen.

HSV Stamm	Polymorphismus	Stumme Mutation	Mit ACV-Resistenz assoziiert	Phänotyp
KOS	as 367 M→T			ACVsens
KOS-M	as 367* M→T		nt 430 add g	ACVres
177845	as 367 M→T	nt 694 t→c		ACVsens
177-M	as 367 M→T	nt 694 t→c	as 216 R→C	ACVres
182167	as 367* M→T	nt 694* t→c	nt 430 add g	ACVres
182-M	as 367* M→T	nt 694* t→c	nt 430 add g	ACVres (PFAsens)
161447	as 118 A→V as 367 M→T	nt 694 t→c		ACVsens
143491	as 118 A→V as 367* M→T	nt 694* t→c	nt 548 add c	ACVres
284019	as 42 L→P as 89 Q→R as 367 M→T	nt 171 t→c nt 694 t→c		ACVsens
284018	as 42 L→P as 89 Q→R as 367 M→T	nt 171 t→c nt 694 t→c	as 200 G→D	ACVres
284035	as 42 L→P as 89 Q→R as 367 M→T	nt 171 t→c nt 694 t→c	as 200 G→D	ACVres

5 Diskussion

5.1 Phänotypische Resistenzuntersuchungen

5.1.1 Schwellenwerte für Resistenz

Ab wann kann man von einer Resistenz ausgehen? Ein wichtiger Anhaltspunkt ist die Einschätzung des behandelnden Arztes, der ein Ansprechen der Therapie wegen der Progedienz oder Persistenz der klinischen Erscheinung der Läsionen gut beurteilen kann. Bei einem konkreten Verdacht muß die Bestätigung im Labor erbracht werden. Im Primärmaterial (Lippenabstrich, etc.) handelt es sich fast immer um Mischpopulationen aus ACV-sensitiven und ACV-resistenten Viren. Bis die Suszeptibilität bestimmt werden kann, können zwei Faktoren das spätere Ergebnis beeinflussen:

- 1) Bei der Anzucht in Abwesenheit von Virostatikum kann es zu einem Selektionsvorteil des Wildtyps gegenüber der resistenten Mutante kommen (Gilbert et al., 2002).
- 2) In dem Patientenmaterial war von vornherein eine geringere Menge an resistenten Mutanten als an Wildtyp.

Um mit dem PRA eine IC_{50} von $\geq 2\mu\text{g/ml}$ ($8,9\mu\text{M}$) ACV zu ermitteln, muß in der zu testenden Mischpopulation ein Anteil von ACV-resistenten Subpopulationen von mindestens 20% vorliegen (Bacon et al., 2003). Wenn sich nun das Verhältnis zu Gunsten des Wildtyps ändert, ist es bei einem so hohen Cut-off ($2\mu\text{g/ml}$), wie er oft angegeben wird möglich, dass man eine Resistenz in vitro nicht erkennt. Chatis und Crumpacker haben schon auf diese Fehleinschätzung der tatsächlichen Inzidenz von Resistenz hingewiesen (Chatis und Crumpacker, 1992). Falschnegative Ergebnisse können nur bei Vorliegen von sequentiellen Isolaten recht sicher vermieden werden. Bei der Untersuchung der Isolate von Patient 14 mit dem SPRA wurde für das erste Isolat eine $IC_{50} < 0,31\mu\text{M}$ ACV und für das zweite $2,5 < IC_{50} > 5\mu\text{M}$ ACV, mit einer deutlichen Tendenz in Richtung $5\mu\text{M}$ ACV, festgestellt. Hier lag also ein mindestens 8-facher Anstieg vor. Man geht davon aus, dass ein 3-5-facher Anstieg ein Anhaltspunkt für eine

Resistenz ist (Gilbert et al., 2002). In der Nachtestung mit dem PRA wurde mit der Probit-Transformation eine $IC_{50}=6,2\mu M$ ACV errechnet. Bei alleiniger Festlegung auf den Cut-off wäre das Isolat als sensitiv einzustufen gewesen. Das Hauptaugenmerk sollte immer auf dem Vergleich mit dem prätherapeutischen Isolat liegen. Den Cut-off so niedrig zu setzen ($3\mu M$) wie in der Studie von Christophers et al. (1998), lässt falschnegative Ergebnisse mit hoher Sicherheit ausschließen. Dabei muß man aber berücksichtigen, dass HSV-2 allgemein eine geringere Suszeptibilität aufweist. Durch Schwankungen, die in einem biologischen System üblich sind, wäre es möglich, dass ein eigentlich sensitives HSV-2 Isolat als resistent eingestuft würde. Elion gibt beispielsweise für einen sensitiven HSV-1 einen IC_{50} -Wert $0,1\mu M$ ACV an und für HSV-2 $2\mu M$ ACV (Elion, 1993), also einen 20-fach höheren Wert. Aufgrund dieses unterschiedlichen Ansprechens auf Virostatika ist eine Typisierung für die Suszeptibilitätsbewertung immer hilfreich. Alle mit dem SPRA getesteten Isolate mit einer $IC_{50} >5\mu M$ ACV und somit als resistent bewerteten Isolate, waren im PRA und A/S-Test mit ihrer IC_{50} oberhalb $8,9\mu M$ ACV angesiedelt. Alle im Rahmen dieser Arbeit getesteten Patientenisolat hatten eine IC_{50} für PFA unterhalb des Cut-offs von $330-350\mu M$. PFA-Resistenz kommt nach SZT wegen der meist kürzeren antiviralen Therapiedauer relativ selten vor. Das Isolat 284018 von Patient 12 hatte aber gegenüber dem prätherapeutischen Isolat im PRA einen 3-fachen Anstieg zu verzeichnen. Es war somit als grenzwertig zu betrachten, da ein 3-facher Anstieg bei PFA als Zeichen für Resistenz gilt (Gilbert et al., 2002).

5.1.2 Phänotypische Testung: Einfluß der Vortitration

Das Weglassen einer Vortitration in einem screening Assay ermöglicht eine Zeitersparnis von 3 Tagen. Als Nachteil ist hier zu betrachten, dass eine mehrfache Bestimmung für die einzelnen Virostatika entfällt, weshalb dies nur für ein Screening geeignet ist. Die Vorbestimmung der $TCID_{50}$ ist als semiquantitative Methode ideal für den CPE-Reduktionstest. Verschiedene Autoren wählten diese Titerbestimmung für die Durchführung eines CRAs. In der Virologie Tübingen wird die $TCID_{50}$ erfolgreich für die Titerbestimmung von CMV und Adenovirus angewandt. Als Titration für die quantitative Bestimmung

mit PRA oder den A/S-Test ist sie jedoch als semiquantitative Methode weniger geeignet. Hier sollte die rein quantitative PFU-Bestimmung erfolgen. Für den PRA hatte sich auch die Schätzung des Titers anhand des SPRAs als ausreichend erwiesen. Für den A/S-Test ist eine genaue Titration für ein verlässliches Ergebnis nötig, da sonst der IC_{50} -Wert verfälscht wird.

5.1.3 Vergleich von vier phänotypischen Testmethoden

Der allgemein als Goldstandard bezeichnete PRA ist für die Suszeptibilitätstestung von HSV maßgebend. Von allen Autoren wird der hohe Arbeitsaufwand bemängelt. Der in der Virologie Tübingen ursprünglich verwendete CPE-Reduktionstest zeichnet sich durch seine relativ einfache Handhabung und die leichte und schnelle Auswertung aus. Die geringeren Werte bei der Testung auf Vero-Zellen könnten durch die erneute Anzüchtung bedingt gewesen sein. Es wäre denkbar, dass dabei die resistente Population einen Selektionsnachteil gegenüber des Wildtyps erlitten hat. Am deutlichsten trat dieser Rückgang bei HSV-Isolat 149502 auf. Auf HFF wurde es mit $>500\mu\text{M}$ ACV bewertet, aber mit $31,3\mu\text{M}$ ACV auf Vero-Zellen, musste man es in diesem Test noch gerade als resistent gelten lassen. Im PRA lag aber mit einer $IC_{50}=1,35\mu\text{M}$ ACV vollste Suszeptibilität vor. Die erhöhte IC_{100} von $1000\mu\text{M}$ PFA im CRA stellte sich im SPRA mit einer $IC_{50} >62,5 < 125\mu\text{M}$ als vollkommen sensitiv heraus. Damit war 149502 der einzige Fall, in dem das Ergebnis aus CRA, PRA und SPRA divergierte. Der IC_{100} -Wert kann mit dem CRA zwar genau ermittelt werden und ist auch reproduzierbar, aber seine Aussagekraft bezüglich Resistenz kann ungenau sein. Dies kann man damit erklären, dass sich die sigmoidale Dosis-Wirkungskurve dem 100%-Wert asymptotisch nähert. Die Aussage über Suszeptibilität ist sehr präzise, solange der IC_{100} -Wert unterhalb des IC_{50} Cut-off-Wertes liegt. In so einem Fall kann mit großer Sicherheit von einer vollen Suszeptibilität ausgegangen werden. Bei hochresistenten Isolaten ist die Validität auch gegeben. Bei Isolaten mit grenzwertiger Resistenz ist aber die quantitative Bewertung der Virusinhibition der qualitativen Beurteilung überlegen. Ein Vorteil des SPRA ist die schnelle Verfügbarkeit eines Ergebnisses nach 2-3 Tagen. Eine gute Reproduzierbarkeit war bei 6 Wiederholungen mit dem Referenzstamm KOS (Tabelle 10, Seite 66)

auch gegeben. Bei den Studien zur ACV-Resistenz, in denen Screenings durchgeführt wurden, hatte man bei Verdacht auf Resistenz immer noch einmal mit genau bestimmten Titer nachgetestet (Danve-Szatanek et al., 2004; Christophers et al., 1998). Da alle Isolate mit einer $IC_{50} > 5 \mu M$ ACV im SPRA bei weiteren Testungen mit PRA und A/S-Test einen IC_{50} -Wert $> 8,9 \mu M$ aufwiesen, ist eine Bestätigung nur bei grenzwertigen Isolaten, wie 268909 ($IC_{50} = 6,2 \mu M$ ACV Probit) angezeigt. Der PRA ermöglicht durch die anschließende Probit-Transformation die mathematische Ermittlung der IC_{50} -Werte. In der Virologie Tübingen wird die Probit-Transformation bereits erfolgreich bei der Resistenztestung von CMV eingesetzt. Diese Software wenden auch einige Autoren für die Auswertung ihrer PRAs für HSV an (z.B. Swierkosz et al., 1987). Probit ist sicher die elegantere Art der Auswertung, als die weiter verbreitete graphische Ermittlung der Virusinhibitionskonzentration. Da der PRA eine Vortitration benötigt eignet er sich besonders gut für die Nachtestung von grenzwertigen Isolaten nach erfolgtem SPRA oder bei eindeutig nachgewiesener ACV-Resistenz mit dem SPRA für die anschließende Testung auf PFA- oder CDV-Suszeptibilität. Bis bei dem A/S-Test ein Ergebnis vorliegt, vergehen mindestens 8 Tage (3 Tage Titerbestimmung, 5 Tage für den Test). Die Vorbereitung der Testplatten fällt aber wesentlich einfacher aus, als bei den beiden Plaquereduktionstests. Das Mikroskopieren für die Auswertung entfällt ebenfalls, da die Auswertung mit dem Fluoreszenzreader erfolgt. Ebenso wie der Dye-uptake-Assay (Morfin et al., 2002) wird auch der A/S-Test ohne Plaquezählung ausgewertet. Bei solchen Verfahren ist die IC_{50} stark von der m.o.i. abhängig, was schon Harmenberg feststellte, aber auch von Kleymann und Werling hervorgehoben wird, welche den A/S-Test zum erstenmal beschrieben haben (Kleymann und Werling, 2004; Harmenberg et al., 1985b). Eine zu große m.o.i. bedingt einen erhöhten IC_{50} -Wert und eine zu kleine m.o.i. einen entsprechend erniedrigten. Ferner dürfte das Ergebnis von der Replikationsgeschwindigkeit der verwendeten Zelllinie und der Replikationsgeschwindigkeit der zu testenden Viruspopulationen abhängen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte immer wieder beobachtet werden, dass die Patientenisolat im PRA kleinere Plaques induzierten als der Referenzstamm.

Bei manchen resistenten Isolaten bildeten sich in der Kontrolle ohne Virostatikum kleinere Plaques, als in Gegenwart von Virostatikum. Eine Beeinflussung der Ergebnisse des A/S-Testes durch dieses unterschiedliche Verhalten ist nicht auszuschließen. Daß die Kurve den 100%-Wert für Zellvitalität nicht erreicht, wie von Kleymann und Werling beschrieben, konnte bei allen Versuchen durchgehend beobachtet werden. Die Ursache liegt wohl hauptsächlich an der Gegenwart von Virus, wie im Rahmen der Untersuchungen mit N3 gesehen werden konnte. Bei alleiniger Gegenwart von N3 auf HFF, lag die Kurve bei niedrigen Konzentrationen von N3 nahe bei 100%, bevor sie wegen der Zytotoxizität von N3 absank, um bei ca. 70 μ M die CC₅₀ zu erreichen. Eine Zelle geht nach Infektion mit Virus in einen Zustand geringerer Zellaktivität über, was innerhalb eines Monolayers durch interzellulären Kontakt auf alle benachbarten Zellen übertragen wird (Kleymann und Werling, 2004). Dieser Test ist theoretisch auf jedes Virus adaptierbar, wenn man die passende m.o.i. für das zu testende Virus und die verwendete Zelllinie empirisch ermittelt hat (Kleymann und Werling, 2004). Auch der A/S-Test erlaubte eine zuverlässige Unterteilung in sensitiv und resistent. Deutlich zu sehen war auch die gesteigerte Sensitivität gegenüber CDV bei ACV-resistenten Isolaten. Dies bestätigt die von anderen Autoren beschriebene Hypersensitivität für CDV von ACV-resistenten Isolaten (Saijo et al., 2002a und 2002b; Mendel et al., 1995b). Korrekterweise muß man das Ergebnis, welches man aus der Grafik abliest, als Eingrenzung durch Klassen (bedingt durch die verwendeten Virostatikakonzentrationen) angeben. Andererseits muß man sich fragen, wie genau man einen Wert in solch einem biologischen System, wie es so ein Test darstellt, überhaupt angeben kann? Bei hochgradiger Resistenz wird das Ergebnis immer ungenauer sein. Ursache sind die größeren Konzentrationsunterschiede der eingesetzten Virostatika (z.B. der Sprung von 250 auf 125 μ M ACV). Dafür erhält man sehr genaue Werte bei den niedrigen Konzentrationen (4, 2, 1, 0,5 μ M ACV). Es wäre sicherlich eine interessante Option, den A/S-Test für den Einsatz als Screeningmethode zu modifizieren.

5.1.4 Phänotypische Charakterisierung generierter Labormutanten

Der generierte resistente Laborstamm KOS-M und die generierten resistenten Stämme 177-M und 182-M, die ursprünglich von primären Patientensisolaten abstammten, hatten im SPRA erwartungsgemäß eine $IC_{50} > 5\mu\text{M}$ ACV. Die Endkonzentration von ca. $13\mu\text{M}$ ACV bei der Propagierung ist von Saijo et al. angegeben worden (Saijo et al., 2002b). Bei dem dort beschriebenen Fall konnte bei dem Patienten unter hochdosierter ACV-Therapie eine Serumkonzentration von ca. $13\mu\text{M}$ gemessen werden. Saijo und Mitarbeiter haben 24 ACV-resistente Laborstämme generiert, deren IC_{50} zwischen ca. 20 - $>450\mu\text{M}$ ACV liegt. Auffällig war die erhöhte $IC_{50} \approx 500\mu\text{M}$ PFA bzw. $337\mu\text{M}$ (Probit) bei 182-M (Tabelle 11, Seite 67). Der Parentalstamm 182167 war bereits ACV-resistent. Die dreiwöchige Propagierung in Gegenwart von $13\mu\text{M}$ ACV hatte vermutlich eine Mutation innerhalb der DNS-Polymerase hervorgerufen, welche Kreuzresistenz mit PFA bewirkt. Hier könnte eine Mutation in Codon 724 der Polymerase vorliegen, die bei ACV- und PFA-resistenten Laborstämmen am häufigsten beschrieben ist (Gilbert et al., 2002). 149-M war nach der Selektionierung erwartungsgemäß hochgradig PFA-resistent. Interessanterweise war 149-M auch ACV-resistent. Hier könnte eine ähnliche Ursache wie bei 182-M vorliegen, nur dass hier die Mutante in Gegenwart von PFA innerhalb von nur 4 Tagen isoliert wurde. Inwiefern die Tatsache hier eine Rolle spielt, dass der Parentalstamm 149502 einmal ACV-resistent war, diese Resistenz jedoch offensichtlich durch Passagierung verschwand, kann nicht mehr nachvollzogen werden.

5.1.5 Wirkung von N3 und Bay 12-5793 auf die HSV-Replikation

Derzeit befinden sich ca. 19 gegen HSV wirksame Substanzen in verschiedenen Entwicklungsphasen (Kleymann, 2003). Darunter befinden sich Ribonukleotidreduktase-Inhibitoren, TK-Inhibitoren, Uracil-DNS-Glykosylase-Inhibitoren, Protease-Inhibitoren, DNS-Polymerase-Inhibitoren und Helicase-Primase-Inhibitoren (zu denen Bay 12-5793 zählt). N3 hat hier eine Sonderstellung, da es nicht nur gegen HSV, sondern auch CMV und HIV in vitro wirksam ist. Der Vorteil des A/S-Testes zeigte sich bei der Untersuchung von N3, mit der Möglichkeit auch die CC_{50} für diese neue Substanz erstmals

angeben zu können. Der ermittelte SI von N3 kann durchaus mit den anderen Neuentwicklungen mithalten. Verglichen mit PFA (SI für HSV ca. 10-100) und CDV (SI für HSV-1 (ACV-sens) ca. 10-15) schneidet N3 mit einem SI von bis zu max. 80 gut ab, wenngleich kleiner als bei ACV (SI ca. 250-300) und BAY 57-1293 (SI ca. 2500-3000). Der Referenzstamm KOS und der generierte Laborstamm KOS-M hatten eine geringere Suszeptibilität gegenüber N3 als die getesteten Patientenisolate. Da der IC₅₀-Wert auch im PRA für KOS und KOS-M höher ausfiel (5-6µM N3) ist ein Fehler bei der Vorbereitung der Virusverdünnung auszuschließen. Die besondere Bedeutung von N3 ist in einer vergleichbaren Wirkung bei ACV-sensitiven und ACV-resistenten HSV-Isolaten, sowie GCV-sensitiven und GCV-resistenten CMV-Isolaten zu sehen (Hamprecht et al., in Vorbereitung).

5.2 Untersuchung von HSV UL 23

Mehrere Arbeitsgruppen (Morfin et al., Stranska et al., Harris et al., Chibo et al., Saijo et al.) beschäftigen sich derzeit mit der Untersuchung von UL 23 und UL 30, mit dem Ziel einen schnellen genotypischen Test zu etablieren, wie er bei CMV schon Standard ist. Die häufigsten Mutationen sollen bei UL 23 in homopolymeren G- und C-Abschnitten vorkommen. Solch eine Mutation konnte bei den 4 ACV-resistenten Isolaten 182167, 143491, KOS-M und 182-M nachgewiesen werden. Eine weitere neue Mutation gab es bei den Isolaten 284018 und 284035 von Patient 12: G200D. In einem Laborstamm ist in diesem Codon bereits die Mutation G200C beschrieben (Saijo et al., 2002b). Bei allen drei Isolaten von diesem Patienten fand sich die Mutation L42P, die damit eindeutig dem Polymorphismus zugeordnet werden kann. Diese Mutation ist von Morfin et al., als fraglicher Polymorphismus beschrieben, da nicht mit prätherapeutischen Isolaten verglichen werden konnte (Morfin et al., 2000). Bei allen anderen Mutationen handelte es sich um bereits bekannte. Auffallend war, dass in allen Sequenzen die Mutation M367T vorkam, die für die bei NCBI publizierte Sequenz des Referenzstammes KOS nicht genannt ist. Der von Saijo et al., sequenzierte sensitive HSV Stamm TA1 hat dieselbe stumme Mutation, die auch in allen Sequenzen, bis auf der von KOS und KOS-M, vorkam: nt 694 t→c (Saijo et al., 1999).

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Dissertation war die Etablierung eines zeit- und arbeitsoptimierten, quantitativen, phänotypischen Testsystems zur Erfassung der Aciclovir-Resistenz von klinischen Herpes Simplex Virusisolaten. Den Hintergrund bildet die hohe Inzidenz der Aciclovir-Resistenz bei Patienten nach Stammzelltransplantation, welche in Studien bis zu 30% erreichte. Die Resistenzmechanismen, welche auf molekularbiologischer Ebene der verminderten Suszeptibilität gegenüber Aciclovir zugrunde liegen, sind Mutationen innerhalb des Genabschnittes UL 23, welcher bei Herpes Simplex Viren für die Thymidinkinase kodiert. In seltenen Fällen erfolgen Mutationen innerhalb des für die virale Polymerase kodierenden Genabschnittes UL 30. Für die Etablierung von schnelleren, genotypischen Testungen ist eine genaue Kenntnis des umfangreichen natürlichen Polymorphismus und aller mit Resistenz assoziierten Mutationen innerhalb der Gene UL 23 und UL 30 von HSV 1 und HSV 2 notwendig. Da dies noch nicht ausreichend erfolgt ist, erlaubt nur die Sequenzierung von sequentiellen Patientenisolaten, in Kombination mit der phänotypischen Charakterisierung, die sichere Identifizierung einer Aciclovir-Resistenz.

Für die phänotypische Erfassung der Aciclovir-Resistenz wurden ein CPE (Zytopathischer Effekt)-Reduktionstest, ein Plaquereduktionstest und ein Screening-Plaquereduktionstest, sowie ein auf Chemolumineszenzanalytik basierender Zytopathogenitätstest etabliert und evaluiert. Der Plaquereduktionstest gilt weltweit als Goldstandard, ist jedoch zeit- und arbeitsintensiv.

Von 15 Stammzelltransplantatempfängern wurden 41 sequentielle Isolate phänotypisch charakterisiert und typisiert. 16 Isolate wurden als Aciclovir-resistent identifiziert. Es handelte sich ausschließlich um Herpes Simplex Virus Typ 1. Von 11 Isolaten wurde das für die Thymidinkinase kodierende Gen UL 23 sequenziert. Darunter befanden sich 3 eigens im Rahmen dieser Arbeit generierte Aciclovir-resistente Laborstämme. Eine bisher noch nicht beschriebene Punktmutation in Zusammenhang mit Aciclovir-Resistenz

(G200D) und eine neue Mutation im Rahmen des natürlichen Polymorphismus von UL 23 (A118V) konnten dabei nachgewiesen werden. Aussagen über den natürlichen Polymorphismus konnten nur getroffen werden, da kryokonservierte sequentielle Isolate für die Sequenzanalyse verfügbar waren.

Bei Auftreten einer Aciclovir-Resistenz ist eine weitere Behandlung mit Foscarnet oder Cidofovir möglich. Wenn es sich um Herpes Simplex Virus Typ 1 handelt, ist unter Umständen auch eine weitere Therapie mit Brivudin erfolgreich. Da die gegenwärtigen Behandlungsregime begrenzt sind, besteht Bedarf an neuen antiviral wirksamen Medikamenten. Mit dem auf Chemolumineszenzanalytik basierenden Zytopathogenitätstest konnte die antivirale Wirkung einer an der Universität Tübingen neu synthetisierten Duplexverbindung, einem Nucleosid-Phosphono-Ameisensäurederivat, bei Aciclovir-resistenten Herpes Simplex Viren nachgewiesen und der zugehörige Selektivitätsindex ($SI=CC_{50}/IC_{50}$) bestimmt werden.

7 Literatur

AstraZeneca, (2003)

Fachinformation Foscavir®

Bacon TH, Myron JL, Jeffrey JL, Sarisky RT, Sutton D, (2003)

Herpes simplex virus resistance to acyclovir and penciclovir after two decades of antiviral therapy.

Clinical Microbiology Reviews 16:114-128

Balasubramaniam NK, Veerisetty V, Gentry GA, (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.

J Gen Virol 71:2979-2987

Balfour HH Jr., (1999)

Antiviral Drugs.

N Engl J Med 340:1255-1268

Bestman-Smith J, Schmit I, Papadopoulou B, Boivin G (2001)

Highly reliable heterologous system for evaluating resistance of clinical herpes simplex virus isolates to nucleoside analogues.

J Virol 75:3105-3110

Birch CJ, Tachedjian G, Doherty RR, Hayes K, Gust ID, (1990)

Altered sensitivity to antiviral drugs of herpes simplex virus isolates from a patient with the acquired immunodeficiency syndrom.

J Inf Dis 162:731-734

Burns WH, Saral R, Santos GW, Laskin OL, Leitman PS, Mc Laren C, Barry DW, (1982)

Isolation and characterization of resistant herpes simplex virus after acyclovir therapy.

Lancet 1(8269):421-3

Buxbaum S, Geers M, Gross G, Schöfer H, Rabenau HF, Doerr HW, (2003)

Epidemiology of herpes simplex virus types 1 and 2 in Germany: what has changed?

Med Microbiol Immunol 192:177-181

Chatis PA, Crumpacker CS, (1992)

Resistance of herpesviruses to antiviral drugs.

Antimicrob Agents Chemother 36:1589-95

Christophers J, Clayton J, Craske J, Ward R, Collins P, Trowbridge M, Darby G, (1998)

Survey of resistance of herpes simplex virus to acyclovir in northwest England.

Antimicrob Agents Chemother 42:868-872

Crumpacker CS, Schnipper LE, Marlowe SI, Kowalsky PN, Hershey BJ, Levin MJ, (1982)

Resistance to antiviral drugs of herpes simplex isolated from a patient treated with acyclovir.

New Engl J Med 306:343-6

Crute JJ, Grygon CA, Hargrave KD, Simoneau B, Faucher AM, Bolger G, Kibler P, Liuzzi, Cordingley MG, (2002)

Herpes simplex virus helicase-primase inhibitors are active in animal models of human disease.

Nat Med 8:386–391

Danve C, Morfin F, Thouvenot D, Aymard M, (2002)

A screening dye-uptake assay to evaluate in vitro susceptibility of herpes simplex virus isolates to acyclovir.

J Virol Methods 105:207-217

Danve-Szatanek C, Aymard M, Thouvenot D, Morfin F, Agius G, Bertin I, Billaudel S, Chanzy B, Coste-Burel M, Finkielsztejn L, Fleury H, Hadou T, Henquell C, Lafeuille H, Lafon ME, Le Faou A, Legrand MC, Maille L, Mengelle C, Morand P, Morinet F, Nicand E, Omar S, Picard B, Pozzetto B, Puel J, Raoult D, Scieux C, Segondy M, Seigneurin JM, Teyssou R, Zandotti C, (2004)

Surveillance network for herpes simplex virus resistance to antiviral drugs: 3-year follow-up.

J Clin Microbiol 42:242-249

Darby G, Larder BA, Inglis MM, (1986)

Evidence that the “active centre” of the herpes simplex virus thymidine kinase involves an interaction between three distinct regions of the polypeptide.

J Gen Virol 67:753-8

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 16:569-596

De Clercq E, (2004)

Antiviral drugs in current clinical use.

J Clin Virol 30:115-133

Derse D, Bastow KF, Cheng Y, (1982)

Characterization of the DNA polymerases induced by a group of herpes simplex virus type 1 variants selected for growth in the presence of phosphonoformic acid.

J Biol Chem 257:10251-10260

Elion GB, (1982)

Mechanism of action, spectrum and selectivity of nucleoside analogs. In Mill J, Corey L (eds): "New Directions for Clinical Application and Research."

New York: Elsevier, pp 118-137

Elion GB, (1993)

Acyclovir: Discovery, mechanism of action and selectivity.

J Med Virol Sup 1:2-6

Elion GB, Furman PA, Fyfe JA, DeMiranda P, Beauchamp L, Schaeffer HJ, (1977)

Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5716-5720

Enders JF, Weller TH, Robbins FC, (1949)

Cultivation of the Lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of various human embryonic tissues.

Science 109:85

Field HJ, (2001)

Herpes simplex virus antiviral drug resistance – current trends and future prospects.

J Clin Virol 21:261-269

Gilbert C, Bestman-Smith J, Boivin G, (2002)

Resistance of herpesviruses to antiviral drugs: clinical impacts and molecular mechanisms.

Drug Resist Updat 5:88-114

GlaxoSmithKline, (2003)

Fachinformation Zovirax®

Harmenberg J, Sundquist VA, Gadier H, Leven B, Brannstrom G, Wahren B, (1985b)

Multiplicity dependence of sensitivity of herpes simplex virus isolates to antiviral compounds.

J Antimicrob Chemother 15:567-73

Helgstrand E, Eriksson B, Johansson NG, Lannero B, Larsson A, Misiorny A, Noren JO, Sjoberg B, Stenberg K, Stening G, Stridh S,

Oberg B, (1978)

Trisodium phosphonoformate, a new antiviral compound.
Science 201:819-821.

Herrmann EC Jr., (1961)

Plaque inhibition test for detection of inhibitors of DNA viruses.
Proc Soc Exp Biol Med 107:142-145

Hitchcock MJM, Jaffe HS, Martin JC, Stagg RJ, (1996)

Cidofovir, a new agent with potent anti-herpesvirus activity.
Antiviral Chemistry & Chemotherapy,7:115-127

Hotchin JE, (1955)

Use of methylcellulose gel as a substitute for agar in tissue-culture overlays.
Nature 175:352

Irmiere AF, Manos MM, Jacobson JG, Gibbs JS, Coen DM, 1989

Effect of an amber mutation in the herpes simplex virus thymidine kinase gene on polypeptide synthesis and stability.
Virology 168:210-220

Kleymann G & Werling HO, (2004)

A generally applicable, high throughput screening compatible assay to identify, evaluate and optimise antimicrobial agents for drug therapy.
J Biomol Screen 9:578-587

Kleymann G, (2003)

Novel agents and strategies to treat herpes simplex virus infections.
Expert Opin Invest Drugs 12:165-183

Kleymann G, Fischer R, Betz UA, Hendrix M, Bender W, Scheider U, Handke G, Eckenberg P, Hewlett G, Pevzner C, Baumeister J, Weber O, Henninger K, Keldenich J, Jensen, A, Kolb J, Bach U, Popp A, Maben J, Frappa I, Haebenich D, Lockhoff O, Rubsamen-Waigmann H, (2002)

New helicase-primase inhibitors as drug candidates for the treatment of herpes simplex disease.
Nat Med 8:392–398

Mendel DB, Barkhimer DB, and Chen MS, (1995a)

Biochemical basis for increased susceptibility to cidofovir of herpes simplex viruses with altered or deficient thymidine kinase activity.
Antimicrob Agents Chemother 39:2120-2122

Morfin F, Bilger K, Boucher A, Thiebaut A, Najjioullah F, Bleyzac N, Raus N, Bosshard S, Aymard M, Michallet M, Thouvenot D, (2004)

HSV excretion after bone marrow transplantation: a 4-year survey.
J Clin Virol 30:341-345

Morfin F, Souillet G, Bilger K, Ooka T, Aymard M, (2000)
Genetic characterization of thymidine kinase from acyclovir-resistant and – susceptible herpes simplex virus type 1 isolated from bone marrow transplant recipients.
Infect Dis 182:290-293

Morfin F, Thouvenot D, (2003)
Herpes simplex virus resistance to antiviral drugs.
J Clin Virol 26:29-37

Pharmacia & Upjohn, (1998)
Fachinformation Vistide®

Reed FC and Muench H, (1938)
A simple method for estimating fifty percent endpoints.
Am J Hyg 27:493-497

Roizman B and Sears AE (2001)
Chapter 71-73
In Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds): “Fields Virology”
Philadelphia, New York: Lippincott Raven

Safrin S, Elbeik T, Phan L, Robinson D, Rush J, Elbaggari A, Mills J, (1994)
Correlation between response to acyclovir and foscarnet therapy and in vitro susceptibility result for isolates of herpes simplex virus from human immunodeficiency virus-infected patients.
Antimicrob Agents Chemother 38:1246-1250

Saijo M, Suzutani T, De Clercq, Niikura M, Maeda A, Morikawa S, Kurane I, (2002b)
Genotypic and phenotypic characterization of the thymidine kinase of ACV-resistant HSV-1 derived from an acyclovir-sensitive herpes simplex virus type 1 strain.
Antivir Res 56:253-262

Saijo M, Suzutani T, Itoh K, Hirano Y, Muroso K, Nagamine M, Mizuta K, Niikura M, Morikawa S, (1999)
Nucleotide sequence of thymidine kinase gene of sequential acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1 isolates recovered from a child with wiskott-aldrich syndrom: Evidence for reactivation of acyclovir-resistant herpes simplex virus.
J Med Virol 58:387-393

Saijo M, Yasuda Y, Yabe H, Kato S, Suzutani T, De Clercq E, Niikura M, Maeda A, Kurane I, Morikawa S, (2002a)
Bone marrow transplantation in a child with wiskott-aldrich syndrome latently infected with acyclovir-resistant (acvr) herpes simplex virus type 1:

Emergence of foscarnet-resistant virus originating from the ACVr virus.
J Med Virol 46:2848-2853

Schaeffer HJ, Beauchamp L, DeMiranda P, Elion GB, Bauer DJ, Collins P, (1978)

9-(2-Hydroxyethoxymethyl)guanine activity against viruses of the herpes group.

Nature 272:583-585

Sibrack CD, Gutman LT, Wilfert CM, McLaren C, St Clair MH, Keller PM, Barry DW, (1982)

Pathogenicity of acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1 from an immunodeficient child.

J Infect Dis 146:673-82

Smith KO, (1964)

Relationship between the envelope and the infectivity of herpes simplex virus.

Proc Soc Exp Biol Med 115:814-816

Stranska R, Schuurman R, Scholl DR, Jollick JA, Shaw CJ, Loef C, Polman M, van Loon AM, (2004a)

ELVIRA HSV, a yield reduction assay for rapid herpes simplex virus susceptibility testing.

Antimicrob Agents Chemother 48:2331-3

Stranska R, van Loon AM, Polman M, Beersma MFC, Bredius RGM, Lankester AC, Meijer E, Schuurman R, (2004b)

Genotypic and phenotypic characterization of acyclovir-resistant herpes simplex viruses isolated from haematopoietic stem cell transplant recipients.

Antiviral Therapy 9:565-575

Swierkosz EM, Scholl DR, Brown JL, Jollick JD, Gleaves CA, (1987)

Improved DNA hybridization method for detection of acyclovir-resistant herpes simplex virus.

Antimicrob Agents Chemother 31:1465-1469

Tebas P, Scholl D, Jollick J, McHarg K, Arens M, Olivo PD, (1998)

A rapid assay to screen for drug-resistant herpes simplex virus.

Infect Dis 177:217-20

Wutzler P, Doerr HW, Färber I, Eichhorn U, Helbig B, Sauerbrei A, Brandstädt A, Rabenau HF, (2000)

Seroprevalence of herpes simplex virus type 1 and type 2 in selected german populations – Relevance for the incidence of genital herpes.

J Med Virol 61:201-207

8 Anhang

Die folgende Sequenz von UL23 mit angrenzender Region ist dem bei NCBI veröffentlichten, kompletten Genom des humanen Herpesvirus 1 entnommen. Die Aminosäuresequenz wurde hinzugefügt. Die verwendeten Primer für PCR und Sequenzierung sind angegeben.

File: STRAIN17
Range:1 - 1131

PCR Primer S6F: **a cag cgt gcc gca gat**
5` a cag cgt gcc gca gat

```

ctt g                pf: c ccg cac ctc ttt ggc aag cg
ctt ggt ggc gtg aaa ctc ccg cac ctc ttc ggc cag cgc ctt gta gaa gcg cgt

1  Met Ala Ser Tyr Pro Cys His Gln His Ala Ser Ala Phe Asp Gln Ala Ala Arg
f0: atg gct tcg tac ccc tgc cat caa cac g                36          45          54
5'  ATG GCT TCG TAC CCC TGC CAT CAA CAC GCG TCT GCG TTC GAC CAG GCT GCG CGT

19 Ser Arg Gly His Asn Asn Arg Arg Thr Ala Leu Arg Pro Arg Arg Gln Gln Lys
    63          72          81          90          99          108
TCT CGC GGC CAT AAC AAC CGA CGT ACG GCG TTG CGC CCT CGC CGG CAA CAA AAA

37 Ala Thr Glu Val Arg Leu Glu Gln Lys Met Pro Thr Leu Leu Arg Val Tyr Ile
    117         126         135         144         153         162
GCC ACG GAA GTC CGC CTG GAG CAG AAA ATG CCC ACG CTA CTG CGG GTT TAT ATA

55 Asp Gly Pro His Gly Met Gly Lys Thr Thr Thr Thr Gln Leu Leu Val Ala Leu
    171         180         189         198         207         216
GAC GGT CCC CAC GGG ATG GGG AAA ACC ACC ACC ACG CAA CTG CTG GTG GCC CTG

73 Gly Ser Arg Asp Asp Ile Val Tyr Val Pro Glu Pro Met Thr Tyr Trp Arg Val
    225         234         243         252         261         270
GGT TCG CGC GAC GAT ATC GTC TAC GTA CCC GAG CCG ATG ACT TAC TGG CGG GTG

91 Leu Gly Ala Ser Glu Thr Ile Ala Asn Ile Tyr Thr Thr Gln His Arg Leu Asp
    279         288         297         306         315         324
TTG GGG GCT TCC GAG ACA ATC GCG AAC ATC TAC ACC ACA CAA CAC CGC CTC GAC

109 Gln Gly Glu Ile Ser Ala Gly Asp Ala Ala Val Val Met Thr Ser Ala Gln Ile
    333         342         351         360         369         378
CAG GGT GAG ATA TCG GCC GGG GAC GCG GCG GTG GTA ATG ACA AGC GCC CAG ATA

127 Thr Met Gly Met Pro Tyr Ala Val Thr Asp Ala Val Leu Ala Pro His Ile Gly
    f 392: ct tat gcc gtg acc gac gcc                423         432
ACA ATG GGC ATG CCT TAT GCC GTG ACC GAC GCC GTT CTG GCT CCT CAT ATC GGG

145 Gly Glu Ala Gly Ser Ser His Ala Pro Pro Pro Ala Leu Thr Leu Ile Phe Asp
    441         450         459         468         477         486
GGG GAG GCT GGG AGC TCA CAT GCC CCG CCC CCG GCC CTC ACC CTC ATC TTC GAC

```

Anhang

163 Arg His Pro Ile Ala Ala Leu Leu Cys Tyr Pro Ala Ala Arg Tyr Leu Met Gly
 495 504 513 522 531 540
 CGC CAT CCC ATC GCC GCC CTC CTG TGC TAC CCG GCC GCG CGA TAC CTT ATG GGC

181 Ser Met Thr Pro Gln Ala Val Leu Ala Phe Val Ala Leu Ile Pro Pro Thr Leu
 549 558 567 576 585 594
 AGC ATG ACC CCC CAG GCC GTG CTG GCG TTC GTG GCC CTC ATC CCG CCG ACC TTG

199 Pro Gly Thr Asn Ile Val Leu Gly Ala Leu Pro Glu Asp Arg His Ile Asp Arg
 603 612 621 630 639 648
 CCC GGC ACA AAC ATC GTG TTG GGG GCC CTT CCG GAG GAC AGA CAC ATC GAC CGC

217 Leu Ala Lys Arg Gln Arg Pro Gly Glu Arg Leu Asp Leu Ala Met Leu Ala Ala
 657 666 675 684 693 702
 CTG GCC AAA CGC CAG CGC CCC GGC GAG CGG CTT GAC CTG GCT ATG CTG GCC GCG

235 Ile Arg Arg Val Tyr Gly Leu Leu Ala Asn Thr Val Arg Tyr Leu Gln Gly Gly
 711 720 729 738 747 756
 ATT CGC CGC GTT TAT GGG CTG CTT GCC AAT ACG GTG CGG TAT CTG CAG GGC GGC

253 Gly Ser Trp Arg Glu Asp Trp Gly Gln Leu Ser Gly Ala Ala Val Pro Pro Gln
 765 f 782: **ag ctt tcg ggg acg gcc gtg** 810
 GGG TCG TGG CGG GAG GAT TGG GGA CAG CTT TCG GGG GCG GCC GTG CCG CCC CAG

271 Gly Ala Glu Pro Gln Ser Asn Ala Gly Pro Arg Pro His Ile Gly Asp Thr Leu
 819 828 837 846 855 864
 GGT GCC GAG CCC CAG AGC AAC GCG GGC CCA CGA CCC CAT ATC GGG GAC ACG TTA

289 Phe Thr Leu Phe Arg Ala Pro Glu Leu Leu Ala Pro Asn Gly Asp Leu Tyr Asn
 873 882 891 900 909 918
 TTT ACC CTG TTT CGG GCC CCC GAG TTG CTG GCC CCC AAC GGC GAC CTG TAT AAC

307 Val Phe Ala Trp Ala Leu Asp Val Leu Ala Lys Arg Leu Arg Pro Met His Val
 927 936 945 954 963 972
 GTG TTT GCC TGG GCT TTG GAC GTC TTG GCC AAA CGC CTC CGT CCC ATG CAT GTC

325 Phe Ile Leu Asp Tyr Asp Gln Ser Pro Ala Gly Cys Arg Asp Ala Leu Leu Gln
 981 990 999 1008 1017 1026
 TTT ATC CTG GAT TAC GAC CAA TCG CCC GCC GGC TGC CGG GAC GCC CTG CTG CAA

343 Leu Thr Ser Gly Met Val Gln Thr His Val Thr Thr Pro Gly Ser Ile Pro Thr
 1035 1044 1053 1062 1071 1080
 CTT ACC TCC GGG ATG GTC CAG ACC CAC GTC ACC ACC CCA GGC TCC ATA CCG ACG

361 Ile Cys Asp Leu Ala Arg Thr Phe Ala Arg Glu Met Gly Glu Ala Asn ***
 1089 1098 1107 1116 1125
 ATC TGC GAC CTG GCG CGC ACG TTT GCC CGG GAG ATG GGG GAG GCT AAC TGA 3'
 aac acg gaa gga gac aat acc gga agg aac ccg cgc tat gac ggc aat aaa
 aag aca gaa taa aac gca cgg gtg ttg ggt cgt ttg ttc ata aac gcg ggg
 ttc ggt ccc agg gct ggc act ctg tcg ata 3`
 PCR Sir: **cc cga ccg tga gac agc tat** 5`

Nukleotid- und Aminosäuresequenz des sequenzierten Referenzstammes KOS. Mutationen im Rahmen des Polymorphismus sind grau hinterlegt. Fragliche sind mit * markiert. Mutationen die zu ACV-Resistenz führen sind rot eingetragen. Aktive (nach Darby et al., 1986) und konservierte Regionen (nach Balasubramaniam et al., 1990) sind vermerkt. Der einzige Unterschied innerhalb der Sequenz des verwendeten Referenzstammes und der bei NCBI publizierten Sequenz (Irmiere et al., 1989) ist der Austausch M367T.

File: KOS1128B
Range: 1 - 1131

					Gly													Val*		
1	Met	Ala	Ser	Tyr	Pro	Cys	His	Gln	His	Ala	Ser	Ala	Phe	Asp	Gln	Ala	Ala	Arg		
			9			18		27			36			45			54			
5'	ATG	GCT	TCG	TAC	CCC	TGC	CAT	CAA	CAC	GCG	TCT	GCG	TTC	GAC	CAG	GCT	GCG	CGT		
19	Ser	Arg	Gly	His	Asn*	Asn	Arg	Arg	Thr	Ala	Leu	Arg	Pro	Arg	Arg	Gln	Gln	Lys*		
			63			72		81			90		99			108				
	TCT	CGC	GGC	CAT	AGC	AAC	CGA	CGT	ACG	GCG	TTG	CGC	CCT	CGC	CGG	CAG	CAA	GAA		
37	Ala	Thr	Glu	Val	His	Pro*	Leu	Glu	Gln	Lys	Met	Pro	Thr	Leu	Leu	Trp	Arg	Val	Tyr	Ile
			117			126		135			144					153		162		
	GCC	ACG	GAA	GTC	CGC	CTG	GAG	CAG	AAA	ATG	CCC	ACG	CTA	CTG	CGG	GTT	TAT	ATA		
																				ATP Bindungsstelle

Konservierte Region I: AS 50-66: 

55	Asn	His	Arg			Asn	Ile		Asn											
	Asp	Gly	Pro	His	Gly	Met	Gly	Lys	Thr	Thr	Thr	Gln	Leu	Leu	Val	Ala	Leu			
			171			180		189			198		207		216					
	GAC	GGT	CCT	CAC	GGG	ATG	GGG	AAA	ACC	ACC	ACC	ACG	CAA	CTG	CTG	GTG	GCC	CTG		
							Del. A													



73	Gly	Ser	Arg	Asp	Asn*	Ile	Val	Tyr	Val	Pro	Glu	Pro	Met	Ile	Thr	Tyr	Trp	Arg	Gln	Val
			225			234		243			252		261			270				
	GGT	TCG	CGC	GAC	GAT	ATC	GTC	TAC	GTA	CCC	GAG	CCG	ATG	ACT	TAC	TGG	CAG	GTG		
					Del. A															

Kons. Region II: AS 79-91: 

91	Leu	Gly	Ala	Ser	Glu	Thr	Ile	Ala	Asn	Ile	Tyr	Thr	Thr	Gln	His	Arg	Leu	Asp
			279			288		297			306		315		324			
	CTG	GGG	GCT	TCC	GAG	ACA	ATC	GCG	AAC	ATC	TAC	ACC	ACA	CAA	CAC	CGC	CTC	GAC



109	Gln	Gly	Glu	Ile	Ser	Ala	Gly	Asp	Ala	Ala	Val	Val	Met	Thr	Ser	Ala	Gln	Ile
			333			342		351			360		369		378			
	CAG	GGT	GAG	ATA	TCG	GCC	GGG	GAC	GCG	GCG	GTG	GTA	ATG	ACA	AGC	GCC	CAG	ATA

127	Thr	Met	Asp	Met	Pro	Tyr	Ala	Val	Thr	Asp	Ala	Val	Leu	Ala	Pro	His	Ile	Asn
			387			396		405			414		423		432			
	ACA	ATG	GGC	ATG	CCT	TAT	GCC	GTG	ACC	GAC	GCC	GTT	CTG	GCT	CCT	CAT	ATC	GGG
																		Add. G

Anhang

145 Gly Glu Ala Gly Ser Ser His Ala Pro Pro Pro Ala Leu Thr Leu Ile Phe Asp
 441 450 459 468 477 486
 GGG GAG GCT GGG AGC TCA CAT GCC CCG CCC CCG GCC CTC ACC CTC ATC TTC GAC

Del. C

Konservierte Region III: AS 162-176:

Nukleosid Bindungsstelle

					Thr					Arg		Val	Gln					
163	Arg	His	Pro	Ile	Ala	Ala	Leu	Leu	Cys	Tyr	Pro	Ala	Ala	Arg	Tyr	Leu	Met	Gly
						504			513			522			531			540
	CGC	CAT	CCC	ATC	GCC	GCC	CTC	CTG	TGC	TAC	CCG	GCC	GCG	CGA	TAC	CTT	ATG	GGC

181 Ser Met Thr Pro Gln Ala Val Leu Ala Phe Val Ala Leu Ile Pro Pro Thr Leu
 549 558 567 576 585 594
 AGC ATG ACC CCC CAG GCC GTG CTG GCG TTC GTG GCC CTC ATC CCG CCG ACC TTG

Del. C

199 Pro Gly Thr Asn Ile Val Leu Gly Ala Leu Pro Glu Asp Arg His Ile Asp Arg
 603 612 621 630 639 648
 CCC GGC ACA AAC ATC GTG TTG GGG GCC CTT CCG GAG GAC AGA CAC ATC GAC CGC

Konservierte Region IV AS 212-226:

217 Leu Ala Lys Arg Gln Arg Pro Gly Glu Arg Leu Asp Leu Ala Met Leu Ala Ala
 657 666 675 684 693 702
 CTG GCC AAA CGC CAG CGC CCC GGC GAG CGG CTT GAC CTG GCT ATG TTG GCC GCG

Del. C

235 Ile Arg Arg Val Tyr Glu Leu Leu Ala Asn Thr Val Arg Tyr Leu Gln Gly Gly
 711 720 729 738 747 756
 ATT CGC CGC GTT TAC GGG CTG CTT GCC AAT ACG GTG CGG TAT CTG CAG GGC GGC

253 Gly Ser Trp Arg Glu Asp Trp Gly Gln Leu Ser Gly Thr Ala Val Pro Pro Gln
 765 774 783 792 801 810
 GGG TCG TGG CGG GAG GAT TGG GGA CAG CTT TCG GGG ACG GCC GTG CCG CCC CAG

271 Gly Ala Glu Pro Gln Ser Asn Ala Gly Pro Arg Pro His Ile Gly Asp Thr Leu
 819 828 837 846 855 864
 GGT GCC GAG CCC CAG AGC AAC GCG GGC CCA CGA CCC CAT ATC GGG GAC ACG TTA

Konservierte Region V AS 281-292:

289 Phe Thr Leu Phe Arg Ala Pro Glu Leu Leu Ala Pro Asn Gly Asp Leu Tyr Asn
 873 882 891 900 909 918
 TTT ACC CTG TTT CGG GCC CCC GAG TTG CTG GCC CCC AAC GGC GAC CTG TAT AAC

307 Val Phe Ala Trp Ala Leu Asp Val Leu Ala Lys Arg Leu Arg Pro Met His Val
 927 936 945 954 963 972
 GTG TTT GCC TGG GCC TTG GAC GTC TTG GCC AAA CGC CTC CGT CCC ATG CAC GTC

Anhang

325 Phe Ile Leu Asp Tyr Asp Gln Ser Pro Ala Gly Cys Arg Asp Ala Leu Leu Gln
981 990 999 1008 1017 1026
TTT ATC CTG GAT TAC GAC CAA TCG CCC GCC GGC TGC CGG GAC GCC CTG CTG CAA

Ile
343 Leu Thr Ser Gly Met Val Gln Thr His Val Thr Thr Pro Gly Ser Ile Pro Thr
1035 1044 1053 1062 1071 1080
CTT ACC TCC GGG ATG GTC CAG ACC CAC GTC ACC ACC CCA GGC TCC ATA CCG ACG

Del. C

Del. A

Pro* Met Ala* Pro His
361 Ile Cys Asp Leu Ala Arg Thr Phe Ala Arg Glu Met Gly Glu Ala Asn ***
1089 1098 1107 1116 1125
ATC TGC GAC CTG GCG CGC ACG TTT GCC CGG GAG ATG GGG GAG GCT AAC TGA 3'

Anhang

Aminosäure Sequenz des UL 23 Genproduktes Thymidinkinase der sequenzierten HSV Stämme. Mutationen im Rahmen des natürlichen Polymorphismus sind grau hinterlegt. Mutationen die zu ACV-Resistenz führen sind rot hervorgehoben. Stop-Codons sind durch * gekennzeichnet.

```

KOS      1 M A S Y P C H Q H A S A F D Q A A R S R G H S N R R T A L R
KOS-M    1 M A S Y P C H Q H A S A F D Q A A R S R G H S N R R T A L R
177845   1 M A S Y P C H Q H A S A F D Q A A R S R G H S N R R T A L R
177-M    1 M A S Y P C H Q H A S A F D Q A A R S R G H S N R R T A L R
182167   1 M A S Y P C H Q H A S A F D Q A A R S R G H S N R R T A L R
182-M    1 M A S Y P C H Q H A S A F D Q A A R S R G H S N R R T A L R
161447   1 M A S Y P C H Q H A S A F D Q A A R S R G H S N R R T A L R
143491   1 M A S Y P C H Q H A S A F D Q A A R S R G H S N R R T A L R
284019   1 M A S Y P C H Q H A S A F D Q A A R S R G H S N R R T A L R
284018   1 M A S Y P C H Q H A S A F D Q A A R S R G H S N R R T A L R
284035   1 M A S Y P C H Q H A S A F D Q A A R S R G H S N R R T A L R
  
```

```

KOS      31 P R R Q Q E A T E V R L E Q K M P T L L R V Y I D G P H G M
KOS-M    31 P R R Q Q E A T E V R L E Q K M P T L L R V Y I D G P H G M
177845   31 P R R Q Q E A T E V R L E Q K M P T L L R V Y I D G P H G M
177-M    31 P R R Q Q E A T E V R L E Q K M P T L L R V Y I D G P H G M
182167   31 P R R Q Q E A T E V R L E Q K M P T L L R V Y I D G P H G M
182-M    31 P R R Q Q E A T E V R L E Q K M P T L L R V Y I D G P H G M
161447   31 P R R Q Q E A T E V R L E Q K M P T L L R V Y I D G P H G M
143491   31 P R R Q Q E A T E V R L E Q K M P T L L R V Y I D G P H G M
284019   31 P R R Q Q E A T E V R P E Q K M P T L L R V Y I D G P H G M
284018   31 P R R Q Q E A T E V R P E Q K M P T L L R V Y I D G P H G M
284035   31 P R R Q Q E A T E V R P E Q K M P T L L R V Y I D G P H G M
  
```

```

KOS      61 G K T T T T Q L L V A L G S R D D I V Y V P E P M T Y W Q V
KOS-M    61 G K T T T T Q L L V A L G S R D D I V Y V P E P M T Y W Q V
177845   61 G K T T T T Q L L V A L G S R D D I V Y V P E P M T Y W Q V
177-M    61 G K T T T T Q L L V A L G S R D D I V Y V P E P M T Y W Q V
182167   61 G K T T T T Q L L V A L G S R D D I V Y V P E P M T Y W Q V
182-M    61 G K T T T T Q L L V A L G S R D D I V Y V P E P M T Y W Q V
161447   61 G K T T T T Q L L V A L G S R D D I V Y V P E P M T Y W Q V
143491   61 G K T T T T Q L L V A L G S R D D I V Y V P E P M T Y W Q V
284019   61 G K T T T T Q L L V A L G S R D D I V Y V P E P M T Y W R V
284018   61 G K T T T T Q L L V A L G S R D D I V Y V P E P M T Y W R V
284035   61 G K T T T T Q L L V A L G S R D D I V Y V P E P M T Y W R V
  
```

```

KOS      91 L G A S E T I A N I Y T T Q H R L D Q G E I S A G D A A V V
KOS-M    91 L G A S E T I A N I Y T T Q H R L D Q G E I S A G D A A V V
177845   91 L G A S E T I A N I Y T T Q H R L D Q G E I S A G D A A V V
177-M    91 L G A S E T I A N I Y T T Q H R L D Q G E I S A G D A A V V
182167   91 L G A S E T I A N I Y T T Q H R L D Q G E I S A G D A A V V
182-M    91 L G A S E T I A N I Y T T Q H R L D Q G E I S A G D A A V V
161447   91 L G A S E T I A N I Y T T Q H R L D Q G E I S A G D A V V V
143491   91 L G A S E T I A N I Y T T Q H R L D Q G E I S A G D A V V V
284019   91 L G A S E T I A N I Y T T Q H R L D Q G E I S A G D A A V V
284018   91 L G A S E T I A N I Y T T Q H R L D Q G E I S A G D A A V V
284035   91 L G A S E T I A N I Y T T Q H R L D Q G E I S A G D A A V V
  
```

```

KOS      121 M T S A Q I T M G M P Y A V T D A V L A P H I G G E A G S S
KOS-M    121 M T S A Q I T M G M P Y A V T D A V L A P H I G G G G W E L
177845   121 M T S A Q I T M G M P Y A V T D A V L A P H I G G E A G S S
177-M    121 M T S A Q I T M G M P Y A V T D A V L A P H I G G E A G S S
  
```

Anhang

182167 121 M T S A Q I T M G M P Y A V T D A V L A P H I G G **G G W E L**
 182-M 121 M T S A Q I T M G M P Y A V T D A V L A P H I G G **G G W E L**
 161447 121 M T S A Q I T M G M P Y A V T D A V L A P H I G G E A G S S
 143491 121 M T S A Q I T M G M P Y A V T D A V L A P H I G G E A G S S
 284019 121 M T S A Q I T M G M P Y A V T D A V L A P H I G G E A G S S
 284018 121 M T S A Q I T M G M P Y A V T D A V L A P H I G G E A G S S
 284035 121 M T S A Q I T M G M P Y A V T D A V L A P H I G G E A G S S

 KOS 151 H A P P P A L T L I F D R H P I A A L L C Y P A A R Y L M G
 KOS-M 151 **T C P A P G P H P H L R P P S H R R P P V L P G R A I P Y G**
 177845 151 H A P P P A L T L I F D R H P I A A L L C Y P A A R Y L M G
 177-M 151 H A P P P A L T L I F D R H P I A A L L C Y P A A R Y L M G
 182167 151 **T C P A P G P H P H L R P P S H R R P P V L P G R A I P Y G**
 182-M 151 **T C P A P G P H P H L R P P S H R R P P V L P G R A I P Y G**
 161447 151 H A P P P A L T L I F D R H P I A A L L C Y P A A R Y L M G
 143491 151 H A P P P A L T L I F D R H P I A A L L C Y P A A R Y L M G
 284019 151 H A P P P A L T L I F D R H P I A A L L C Y P A A R Y L M G
 284018 151 H A P P P A L T L I F D R H P I A A L L C Y P A A R Y L M G
 284035 151 H A P P P A L T L I F D R H P I A A L L C Y P A A R Y L M G

 KOS 181 S M T P Q A V L A F V A L I P P T L P G T N I V L G A L P E
 KOS-M 181 **Q H D P P G R A G V R G P H P A D L A R H K H R V G G P S G**
 177845 181 S M T P Q A V L A F V A L I P P T L P G T N I V L G A L P E
 177-M 181 S M T P Q A V L A F V A L I P P T L P G T N I V L G A L P E
 182167 181 **Q H D P P G R A G V R G P H P A D L A R H K H R V G G P S G**
 182-M 181 **Q H D P P G R A G V R G P H P A D L A R H K H R V G G P S G**
 161447 181 S M T P Q A V L A F V A L I P P T L P G T N I V L G A L P E
 143491 181 S M T P **P G R A G V R G P H P A D L A R H K H R V G G P S G**
 284019 181 S M T P Q A V L A F V A L I P P T L P G T N I V L G A L P E
 284018 181 S M T P Q A V L A F V A L I P P T L P **D** T N I V L G A L P E
 284035 181 S M T P Q A V L A F V A L I P P T L P **D** T N I V L G A L P E

 KOS 211 D R H I D R L A K R Q R P G E R L D L A M L A A I R R V Y G
 KOS-M 211 **G Q T H R P P G Q T P A P R R A A ***
 177845 211 D R H I D R L A K R Q R P G E R L D L A M L A A I R R V Y G
 177-M 211 D R H I D **C** L A K R Q R P G E R L D L A M L A A I R R V Y G
 182167 211 **G Q T H R P P G Q T P A P R R A A ***
 182-M 211 **G Q T H R P P G Q T P A P R R A A ***
 161447 211 D R H I D R L A K R Q R P G E R L D L A M L A A I R R V Y G
 143491 211 **G Q T H R P P G Q T P A P R R A A ***
 284019 211 D R H I D R L A K R Q R P G E R L D L A M L A A I R R V Y G
 284018 211 D R H I D R L A K R Q R P G E R L D L A M L A A I R R V Y G
 284035 211 D R H I D R L A K R Q R P G E R L D L A M L A A I R R V Y G

 KOS 241 L L A N T V R Y L Q G G G S W R E D W G Q L S G T A V P P Q
 177845 241 L L A N T V R Y L Q G G G S W R E D W G Q L S G T A V P P Q
 177-M 241 L L A N T V R Y L Q G G G S W R E D W G Q L S G T A V P P Q
 161447 241 L L A N T V R Y L Q G G G S W R E D W G Q L S G T A V P P Q
 284019 241 L L A N T V R Y L Q G G G S W R E D W G Q L S G T A V P P Q
 284018 241 L L A N T V R Y L Q G G G S W R E D W G Q L S G T A V P P Q
 284035 241 L L A N T V R Y L Q G G G S W R E D W G Q L S G T A V P P Q

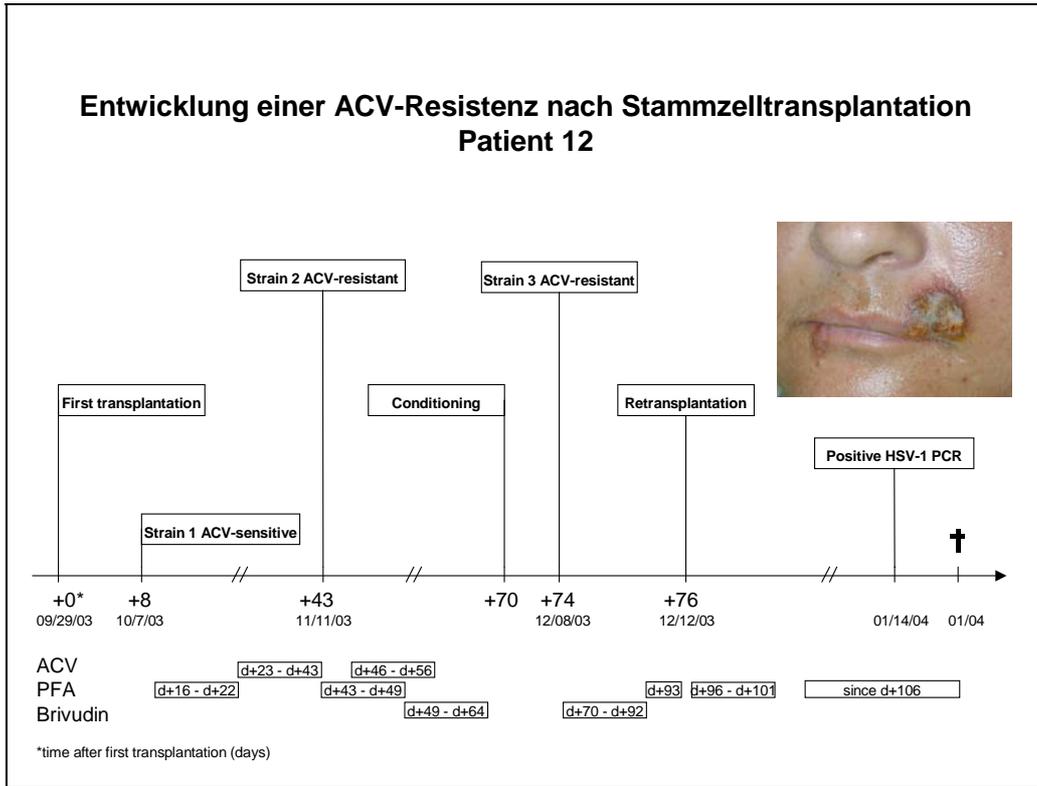
 KOS 271 G A E P Q S N A G P R P H I G D T L F T L F R A P E L L A P
 177845 271 G A E P Q S N A G P R P H I G D T L F T L F R A P E L L A P
 177-M 271 G A E P Q S N A G P R P H I G D T L F T L F R A P E L L A P
 161447 271 G A E P Q S N A G P R P H I G D T L F T L F R A P E L L A P
 284019 271 G A E P Q S N A G P R P H I G D T L F T L F R A P E L L A P
 284018 271 G A E P Q S N A G P R P H I G D T L F T L F R A P E L L A P
 284035 271 G A E P Q S N A G P R P H I G D T L F T L F R A P E L L A P

Anhang

KOS 301 N G D L Y N V F A W A L D V L A K R L R P M H V F I L D Y D
177845 301 N G D L Y N V F A W A L D V L A K R L R P M H V F I L D Y D
177-M 301 N G D L Y N V F A W A L D V L A K R L R P M H V F I L D Y D
161447 301 N G D L Y N V F A W A L D V L A K R L R P M H V F I L D Y D
284019 301 N G D L Y N V F A W A L D V L A K R L R P M H V F I L D Y D
284018 301 N G D L Y N V F A W A L D V L A K R L R P M H V F I L D Y D
284035 301 N G D L Y N V F A W A L D V L A K R L R P M H V F I L D Y D

KOS 331 Q S P A G C R D A L L Q L T S G M V Q T H V T T P G S I P T
177845 331 Q S P A G C R D A L L Q L T S G M V Q T H V T T P G S I P T
177-M 331 Q S P A G C R D A L L Q L T S G M V Q T H V T T P G S I P T
161447 331 Q S P A G C R D A L L Q L T S G M V Q T H V T T P G S I P T
284019 331 Q S P A G C R D A L L Q L T S G M V Q T H V T T P G S I P T
284018 331 Q S P A G C R D A L L Q L T S G M V Q T H V T T P G S I P T
284035 331 Q S P A G C R D A L L Q L T S G M V Q T H V T T P G S I P T

KOS 361 I C D L A R T F A R E M G E A N *
177845 361 I C D L A R T F A R E M G E A N *
177-M 361 I C D L A R T F A R E M G E A N *
161447 361 I C D L A R T F A R E M G E A N *
284019 361 I C D L A R T F A R E M G E A N *
284018 361 I C D L A R T F A R E M G E A N *
284035 361 I C D L A R T F A R E M G E A N *



Curriculum vitae

Börries Niklas Lensch

geboren am 12.09.1976 in Filderstadt;
verheiratet mit
Judith Esther Lensch, geb. Gerlach

Schulbildung

1983 – 1996 Freie Waldorfschule Ludwigsburg
1996 Hochschulreife

Zivildienst

1997 Paracelsus Krankenhaus Bad Liebenzell

Studium

1998 - 2005 Studium der Zahnheilkunde
10/1999 Naturwissenschaftliche Vorprüfung
10/2001 Zahnärztliche Vorprüfung
02-06/2005 Zahnärztliche Prüfung an der Universität Tübingen (letzte Prüfung am 31.05.2005) und Approbation als Zahnarzt

Promotion

10/2002 - 03/2003 Praktische Laborarbeit: Anzucht des Virus- und Zellbestandes und phänotypische Charakterisierung der Virusisolate

03/2004 Teilnahme an der Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie:
„Detection of Drug-Resistant Herpes Simplex Virus (HSV) Strains from a Stem Cell Transplant Recipient: Suitability of a Fluorescein-Based Cytopathogenicity Assay“
B.N. Lensch, G. Kleymann, D. Kampa, B. Hackanson, F. Dörfel, J. Finke, G. Jahn, K. Hamprecht

04/2004 - 09/2004 Genotypische Charakterisierung der Virusisolate
Vortrag im Rahmen des virologisch-wissenschaftlichen Kolloquiums am Institut für Virologie. Thema: HSV und Virostatikaresistenz

03/2005 Teilnahme an der Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie:
“A new amphiphilic duplex-drug linking foscarnet (PFA) with azidothymidine (AZT) acts as a potent replication inhibitor of drug-resistant HSV and HCMV strains”
K. Hamprecht, E. Mikeler, *B.N. Lensch*, G. Kleymann, G. Jahn, H. Schott

04/2005 Teilnahme an der Jahrestagung der European Society for Clinical Virology:
„Aciclovir-Resistant HSV-Infections in Stem Cell Transplantation Recipients“
G. Jahn, *B.N. Lensch*, G. Kleymann, H. Einsele, K. Hamprecht.

Studentische Tätigkeit

04/2000 - 03/2002 Mitglied der Fachschaft Zahnmedizin Tübingen
04/2004 - 08/2005 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Medizinische Virologie
Mitbetreuung der virologischen Praktika für Studenten der Medizin, Biologie und Biochemie

Berufliche Tätigkeit

Seit 09/2005 Vorbereitungsassistent in der zahnärztlichen Praxis von Dr. R. Mäder in Dettingen/Erms