

Aus der Klinik für Pädiatrie m.S. Onkologie und Hämatologie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Phänotypisierung unbeschriebener Mutationen im UL54-
Gen eines multiresistenten klinischen HCMV-Isolats**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Amelie Luisa Schneider

aus Berlin

Datum der Promotion: 17.09.2021

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	VIII
Abstrakt	IX
Abstract	XI
1 Einleitung	1
1.1 Das Humane Cytomegalovirus	1
1.1.1 Morphologie	1
1.1.2 Replikationszyklus	1
1.1.3 Epidemiologie	2
1.1.4 Transmission.....	3
1.2 Die HCMV-Infektion	3
1.2.1 Klinik	3
1.2.2 Diagnostik	4
1.2.3 Prävention.....	5
1.2.4 Therapie.....	6
1.3 Virostatika	6
1.3.1 Ganciclovir (GCV) und Valganciclovir (VGCV)	6
1.3.2 Cidofovir (CDV).....	7
1.3.3 Foscarnet (FOS)	7
1.3.4 Aciclovir (ACV).....	8
1.3.5 Neue Virostatika.....	8
1.4 Hintergrund und Analyse von Virostatika-Resistenzen	9
1.4.1 Mutationen im UL97-Gen.....	10
1.4.2 Mutationen im UL54-Gen.....	11
1.4.3 Genotypische Resistenztestung	12
1.4.4 Phänotypische Resistenztestung	13
1.4.4.1 Rekombinante Phänotypisierung.....	13
1.4.4.2 In vitro-Resistenzassays.....	13
1.5 Klinischer Fall	14
1.6 Zielsetzung der Arbeit	16

2	Material und Methoden.....	18
2.1	Material	18
2.1.1	Bakterien- und Virusstämme	18
2.1.2	Humane Zellen	18
2.1.3	Antikörper	18
2.1.4	Plasmide.....	18
2.1.5	Primer	19
2.1.6	Chemikalien.....	20
2.1.7	Kits.....	22
2.1.8	Bakterienmedien/Agarplatten	22
2.1.9	Zellkulturmedien	22
2.1.10	Verbrauchsgegenstände und Geräte	23
2.1.11	Software	24
2.2	Methoden.....	25
2.2.1	En passant BAC-Mutagenese.....	25
2.2.1.1	Konstruktion von PCR-Fragmenten	26
2.2.1.2	Elektrotransformation und erste Red-Rekombination in GS1783-Bakterien....	27
2.2.1.3	Identifikation rekombinanter Klone (positive Selektion)	28
2.2.1.4	Zweite Red-Rekombination mit Entfernung des positiven Selektionsmarkers.	30
2.2.2	Isolierung und Sequenzierung der BAC DNA	31
2.2.3	Virusrekonstitution in Zellkultur	32
2.2.3.1	Transfektion der BAC-DNA in HEL-Zellen	33
2.2.3.2	Virusernte.....	34
2.2.4	Durchflusszytometrische Immunotitration	34
2.2.4.1.	Infektion und Antikörperfärbung	35
2.2.4.2	Berechnung Virustiter.....	36
2.2.5	In vitro-Wachstumsanalyse durch Erstellen von Wachstumskurven	36
2.2.6	Titer-Reduktions-Assay per durchflusszytometrischer Immunotitration (TRA)	37
2.2.6.1	Bestimmung der EC ₅₀	37
3	Ergebnisse	39
3.1	Konstruktion von HCMV-BAC-Mutanten	41
3.1.1	Herstellung der PCR-Fragmente	41
3.1.2	Positive Selektion nach erster Red-Rekombination.....	41
3.1.3	Negative Selektion nach zweiter Red-Rekombination	43
3.1.4	Sequenzierung der rekombinanten BAC-Klone	43

3.2. Phänotypisierung der HCMV-Mutanten	45
3.2.1 Rekonstitution von infektiösen HCMV-Mutanten in HEL-Zellkultur	45
3.2.2 Virusquantifizierung mittels durchflusszytometrischer Immunotitration.....	47
3.2.3 In vitro-Wachstumsanalyse der HCMV-Mutanten	48
3.2.3.1 Wachstumskurven der HCMV-Mutanten	48
3.2.4 Virostatika-Suszeptibilität der HCMV-Mutanten	51
3.2.4.1 GCV-Suszeptibilität der HCMV-Mutanten	51
3.2.4.2 FOS-Suszeptibilität der HCMV-Mutanten.....	53
3.2.4.3 Gegenüberstellung der Ergebnisse des Titer-Reduktions-Assays und des Plaque-Reduktions-Assays	55
4 Diskussion	59
4.2 Wachstumsverhalten der HCMV-Mutanten	59
4.2 Virostatika-Suszeptibilität der HCMV-Mutanten	61
4.2.1 Einordnung der GCV-Suszeptibilität anhand des Titer-Reduktions-Assays.....	62
4.2.2 Einordnung der FOS-Suszeptibilität anhand des Titer-Reduktions-Assays	63
4.2.3 Einordnung der Virostatika-Suszeptibilität anhand des Plaque-Reduktions-Assays.....	64
4.2.4 Mögliche Einflussfaktoren der unterschiedlichen Methoden auf die Ergebnisse der Resistenztestung	65
4.2.5 Korrelation der Ergebnisse mit dem klinischen Resistenzphänotyp.....	68
4.3 Limitationen und Kritik	71
4.4. Schlussfolgerungen und wissenschaftliche Perspektiven	72
5 Literaturverzeichnis	74
6 Eidesstattliche Versicherung	89
7 Tabellarischer Lebenslauf	90
8 Publikationsliste	92
9 Danksagung	93

Abkürzungsverzeichnis

95% CI	95% Konfidenzintervall (engl. confidence interval)
(w/v)	Massenkonzentration weight by volume
Ω	Ohm
Abb.	Abbildung
ACV	Aciclovir
AK	Antikörper
AML	Akute Myeloische Leukämie
Arab	Arabinose
ARPE-19	Retinale Pigmentepithelzellen
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	Bakterielles Artifizielles Chromosom
bp	Basenpaare
BSA	engl. Bovine Serum Albumin
Camp	Chloramphenicol
CDV	Cidofovir
cop/ml	Kopien pro Milliliter
d	Tag(e), (engl. day(s))
D+/-	Spender*in(nen) positiv/negativ, (engl. donor(s))
ddH ₂ O	doppelt-destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, (engl. deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat(e)
dpi	Tage nach Infektion, (engl. days post-infection)
E	early
EC ₅₀	halbmaximale effektive Konzentration, (engl. half maximal effective concentration)
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
FBS	engl. Fetal Bovine Serum

FOS	Foscarnet
GCV	Ganciclovir
GCV-TP	GCV-Triphosphat
H	Stunde(n), (engl. hour(s))
HCl	Chlorwasserstoff
HCMV	Humanes Cytomegalovirus
HEL	Primäre Humane Embryonale Lungenfibroblasten
HFF	Humane Vorhautfibroblasten, (engl. human foreskin fibroblasts)
HHV-5	Humanes Herpesvirus 5
IE	immediate early
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
I-SceI	Intron-encoded endonuclease I of <i>Saccaromyces cerevisiae</i>
IU/ml	Infektiöse Einheiten pro Milliliter, (engl. infectious units per ml)
Kana	Kanamycin
kbp	Kilobasenpaare(n)
kg	Kilogramm
kV	Kilovolt
L	late
LB	engl. lysogeny broth
mg	Milligramm
MIE	engl. major immediate early
min	Minuten
ml	Milliliter
MOI	Multiplizität der Infektion, (engl. multiplicity of infection)
mV	Millivolt
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
NGS	engl. Next Generation Sequencing
nm	Nanometer

OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
ORF	offene(r) Leserahmen, (engl. open reading frame)
PBS	Phosphate Buffered Saline
pcDNA	plasmid cloning DNA
PCR	Polymerasekettenreaktion, (engl. polymerase chain reaction)
post-SZT	nach allogener Stammzelltransplantation
pp65	Phosphoprotein 65
pUL54	UL54-DNA-Polymerase
pUL97	UL97-Kinase
PRA	Plaque-Reduktions-Assay
psm	positiver Selektionsmarker
R+/-	Empfänger*in(nen) positiv/negativ, (engl. recipient(s))
R ²	Determinationskoeffizient
rpm	revolutions per minute
SD	Standardabweichung, (engl. standard deviation)
SDS	Natriumlaurylsulfat
SOT	Solide Organtransplantation(en)
SZT	allogene Stammzelltransplantation(en)
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus (Bakterium)
TRA	Titer-Reduktions-Assay (per durchflusszytometrischer Immunotitration)
U	Einheiten, (engl. Units)
UL	unique long
US	unique short
VACV	Valaciclovir
VGCV	Valganciclovir
WHO	World Health Organisation
WT	Wildtyp
xg	Maßeinheit für Vielfaches der Erdbeschleunigung (g)
μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
μM	Mikromolar
VI	

Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abbildung 1: Wirkungsweise von GCV und FOS	9
Abbildung 2: Struktureller Aufbau und Mutationen von UL97	11
Abbildung 3: Struktureller Aufbau und Mutationen von UL54	12
Abbildung 4: HCMV-Last des Patienten nach allogener Stammzelltransplantation (SZT)	15
Abbildung 5: Lokalisation der unbeschriebenen Mutationen eines klinischen HCMV-Isolats in UL54	15
Abbildung 6: Prinzip der en passant Mutagenese	25
Abbildung 7: Schema des Titer-Reduktions-Assays per durchflusszytometrischer Immunotitration (TRA)	38
Abbildung 8: Schema der rekombinanten Phänotypisierung	40
Abbildung 9: Erfolgskontrolle des ersten Rekombinationsschrittes in UL97	42
Abbildung 10: Erfolgskontrolle des ersten Rekombinationsschrittes in UL54	42
Abbildung 11: Negative Selektion rekombinanter BAC-Klone nach zweiter Rekombination	43
Abbildung 12: Sequenzierungsnachweis: Erfolgreiche Konstruktion rekombinanter HCMV-BAC-Klone	44
Abbildung 13: Virusrekonstitution in HEL-Zellkultur	46
Abbildung 14: Beispiel einer durchflusszytometrischen Immunotitration	47
Abbildung 15: Replikationskinetik der HCMV-Mutanten unter hoher und niedriger MOI	50
Abbildung 16: Dosis-Wirkungs-Kurven der HCMV-Mutanten mit EC ₅₀ und EC ₅₀ -Ratio für GCV	52
Abbildung 17: Dosis-Wirkungs-Kurven der HCMV-Mutanten mit EC ₅₀ für FOS	54
Abbildung 18: Vergleich der anhand des TRA und PRA ermittelten EC ₅₀ -Ratios	57
Abbildung 19: Schematischer Methoden-Vergleich von TRA und PRA	67
Abbildung 20: Zeitlicher Verlauf der Detektion von UL97- / UL54-Mutationen in vivo und in vitro nach SZT	71

Tabellenverzeichnis

	Seite
Tabelle 1: Risikoklassifikation bei Organ- und Stammzelltransplantation (SOT, SZT) anhand des HCMV-Serologiestatus von Spender*in/Empfänger*in	6
Tabelle 2: Verwendete Mutageneseprimer.....	19
Tabelle 3: Verwendete Diagnostik- und Sequenzierungsprimer	20
Tabelle 4: Verwendete Chemikalien und Hersteller	20
Tabelle 5: Verwendete Lösungen/Puffer	21
Tabelle 6: Verwendete Kits.....	22
Tabelle 7: Zusammensetzung verwendeter Bakterienmedien und Agarplatten	22
Tabelle 8: Zusammensetzung verwendeter Zellkulturmedien	22
Tabelle 9: Verwendete Verbrauchsgegenstände und Geräte	23
Tabelle 10: Verwendete Software (Programme)	24
Tabelle 11: Reaktionsansatz Mutagenese-PCR.....	26
Tabelle 12: Einstellungen Thermocycler Mutagenese-PCR.....	26
Tabelle 13: Reaktionsansatz Diagnostik-PCR.....	30
Tabelle 14: Einstellungen Thermocycler Diagnostik-PCR.....	30
Tabelle 15: Reaktionsansatz PCR für anschließende Sequenzierung.....	32
Tabelle 16: Einstellungen Thermocycler PCR für anschließende Sequenzierung....	32
Tabelle 17: Sequenzierungsansatz	32
Tabelle 18: Virostatika-Konzentrationen für den Titer-Reduktions-Assay	37
Tabelle 19: Mutationen des HCMV-Isolats und mitgeführte Referenzmutationen... 41	
Tabelle 20: Übersicht der anhand des TRA und PRA ermittelten EC ₅₀ -Werte und EC ₅₀ -Ratios für GCV	57
Tabelle 21: Übersicht der anhand des TRA und PRA ermittelten EC ₅₀ -Werte und EC ₅₀ -Ratios für FOS.....	58
Tabelle 22: Ermittelte EC ₅₀ -Ratios im Vergleich mit Angaben der Literatur	64

Abstrakt

Hintergrund: Eine Infektion mit dem Humanen Cytomegalovirus (HCMV) kann sich im Rahmen einer Organ- oder Stammzelltransplantation als potentiell lebensbedrohliche Erkrankung manifestieren, weshalb häufig Virostatika zur Prophylaxe und Therapie eingesetzt werden müssen. Entwickelt sich bei protrahierten Verläufen der Verdacht auf eine Virostatika-Resistenz, bedarf es einer genotypischen Resistenztestung, welche resistenzvermittelnde Mutationen detektieren und gegebenenfalls eine Umstellung des Therapieregimes nach sich ziehen kann. Für die zuverlässige Einordnung detektierter Mutationen ist das Vorliegen einer breiten Datenbasis phänotypisch charakterisierter Mutationen und Polymorphismen in resistenzassoziierten Genen erforderlich.

Ziel dieser Arbeit war es, zwei bislang unbeschriebene Mutationen im HCMV-UL54-Gen (N855I, F861Y), welche im Kontext einer refraktären HCMV-Infektion eines pädiatrischen Patienten nach allogener Stammzelltransplantation detektiert wurden, zu phänotypisieren und ihre mögliche Auswirkung auf das klinische Erscheinungsbild zu beurteilen.

Methoden: Mittels spurloser Mutagenese wurden die UL54-Mutationen einzeln und in Kombination in ein HCMV-Genom integriert, welches als Bakteriell-artifizielles Chromosom (BAC; Stamm TB40-BAC4) vorlag. Daraus resultierende HCMV-BAC-Mutanten wurden als infektiöses Virus in permissiven Fibroblasten rekonstituiert und hinsichtlich ihrer Replikationskinetik charakterisiert. Für die phänotypische Testung der HCMV-Mutanten bezüglich ihrer Virostatika-Suszeptibilität wurde in dieser Arbeit ein Titer-Reduktions-Assay neu etabliert, welches auf der durchflusszytometrischen Immunotitration basiert. In Triplikaten wurden für jede HCMV-Mutante Ganciclovir- und Foscarnet-Konzentrationen bestimmt, welche den Virustiter um 50% reduzieren (EC_{50}). Anhand der EC_{50} -Ratio (EC_{50} Mutante \div EC_{50} Wildtyp) wurde das Verhältnis zum sensitiven HCMV-Wildtyp und mitgeführten Referenzmutanten ermittelt und die Virostatika-Suszeptibilität eingestuft. Ferner erfolgte eine Gegenüberstellung der Ergebnisse des neu etablierten Titer-Reduktions-Assays mit denen eines konventionellen Plaque-Reduktions-Assays.

Ergebnisse: Für die HCMV-UL54-Mutanten N855I, F861Y und N855I/F861Y zeigte sich eine leichte Verzögerung und Verminderung der viralen Replikation. Hinsichtlich der Virostatika-Suszeptibilität wurden mit dem Titer-Reduktions-Assay konsistent niedrigere

EC₅₀-Werte und EC₅₀-Ratios als mit dem Plaque-Reduktions-Assays ermittelt. Die Mutationen UL54-N855I, UL54-F861Y und UL54-N855I/F861Y zeigten sich demnach im Titer-Reduktions-Assay als Ganciclovir- und Foscarnet-sensitiv. Mit dem Plaque-Reduktions-Assay konnte UL54-N855I ebenfalls als Ganciclovir- und Foscarnet-sensitiv charakterisiert werden, während EC₅₀-Ratios für die UL54-Doppelmutante N855I/F861Y eine geringfügige Foscarnet-Resistenz und für UL54-F861Y eine geringgradige Ganciclovir- und Foscarnet-Resistenz anzeigten.

Schlussfolgerungen: Es konnte gezeigt werden, dass die UL54-Mutationen N855I und F861Y einzeln und in Kombination eine geringe Einschränkung der Virusreplikation vermitteln. Eine hochgradige Ganciclovir- und Foscarnet-Resistenzvermittlung kann für die Mutationen mit den Ergebnissen dieser Arbeit ausgeschlossen werden. Eine eindeutige quantitative Einstufung der assoziierten Virostatika-Suszeptibilität und die Bedeutung weiterer retrospektiv detektierter Mutationen für die Entwicklung der klinischen Therapierefraktärität sollte durch weitere phänotypische Testungen eruiert werden. Der neu etablierte Titer-Reduktions-Assay erzielt reproduzierbare und objektive Ergebnisse und kann daher perspektivisch eine alternative Methode für phänotypische Resistenztestungen darstellen.

Abstract

Background: Human cytomegalovirus (HCMV) infection can manifest as a potentially life-threatening disease after organ or stem cell transplantation, which is why antiviral prophylaxis and treatment are often mandatory. If antiviral resistance is suspected, genotypic resistance testing is required to detect resistance-associated mutations in order to adapt the therapy regimen accordingly. Reliable classification of detected mutations requires a broad database of phenotypically characterized mutations and polymorphisms in resistance-associated genes. The aim of this work was to describe previously unknown HCMV-UL54-mutations N855I and F861Y that were detected in the context of a refractory HCMV infection in a pediatric patient after allogeneic stem cell transplantation and to assess their potential impact on the clinical presentation.

Methods: Using markerless mutagenesis, UL54 mutations were introduced individually and in combination into a bacterial artificial chromosome (BAC; strain TB40-BAC4) harboring the HCMV genome. Resulting HCMV BAC mutants were reconstituted as infectious virus in fibroblasts and examined for viral growth kinetics. Using flow cytometric immunotitration, a titer reduction assay was established to assess antiviral drug susceptibility. For each HCMV mutant Ganciclovir and Foscarnet concentrations required to reduce viral titer by 50% (EC_{50}) were determined. Using the EC_{50} ratio (EC_{50} mutant \div EC_{50} parental virus), the relation between undescribed mutations, sensitive HCMV-wildtype and well-known reference mutants was described and antiviral drug susceptibility was classified. Furthermore, results of the titer reduction assay were compared to those of a conventional plaque reduction assay.

Results: UL54-mutations N855I, F861Y and N855I/F861Y slightly delayed and restricted viral growth. Consistently, the TRA yielded lower EC_{50} values and EC_{50} ratios than the plaque reduction assay. Based on the titer reduction assay, the mutations were found to be sensitive to Ganciclovir and Foscarnet. EC_{50} ratios resulting from plaque reduction assay indicated low-grade foscarnet resistance for the UL54 double mutant N855I/F861Y and low-grade ganciclovir and foscarnet resistance for UL54-F861Y. UL54-N855I was characterized as ganciclovir- and foscarnet-sensitive.

Conclusion: The UL54-mutations N855I and F861Y individually and in combination confer a slight viral growth restriction, but high-grade ganciclovir and foscarnet resistance

can be excluded. A precise quantitative classification of conferred antiviral drug susceptibility and the significance of later detected mutations for the development of refractory HCMV infection should be elucidated by further phenotypic testing. The established titer reduction assay provides reproducible and objective results, making it a possible prospective alternative method for phenotypic resistance testing.

1 Einleitung

1.1 Das Humane Cytomegalovirus

Das Humane Cytomegalovirus (HCMV) ist ein Herpesvirus, welches den *Betaherpesvirinae* zugeteilt wird und auch als Humanes Herpesvirus 5 (HHV-5) bekannt ist (1). Der Name Cytomegalovirus entstand aufgrund seiner charakteristischen Eigenschaft, in infizierten Zellen große intrazelluläre Einschlusskörperchen zu bilden, die zum mikroskopischen Erscheinungsbild von Eulenaugenzellen („owl’s eyes“) und einer Zunahme des Zellvolumens führen (2, 3). Charakteristisch für alle Herpesviren und somit auch für HCMV ist, dass die viralen Genome nach einer Infektion lebenslang in latenter Form im Organismus verbleiben (2, 4, 5).

1.1.1 Morphologie

Das reife Viruspartikel (Virion) des HCMV hat einen Durchmesser von 150-200 nm und setzt sich von außen nach innen aus einer Lipiddoppelmembran (Virushüllmembran) mit zahlreichen viralen Glykoproteinen, dem proteinreichen Tegument und dem ikosaedrischen Nukleokapsid, welches die lineare Doppelstrang-DNA einbettet, zusammen. Von den insgesamt acht derzeit bekannten humanpathogenen Herpesviren ist das HCMV das größte, bestehend aus einem Genom mit rund 230 Kilobasenpaaren (kbp) (2, 3, 5). Einteilen lässt sich das Genom in *unique short* (US)- und *unique long* (UL) Regionen und repetitive Sequenzen an den Termini des Genoms sowie zwischen den US- und UL-Abschnitten. Der Großteil der codierenden Gene befindet sich als offene Leserahmen (ORF) in den US- und UL-Regionen (3, 4).

1.1.2 Replikationszyklus

Das Virus tritt über die Bindung von viralen Oberflächenmolekülen (Glykoproteinen) an spezifische Oberflächenrezeptoren und daraus folgender Fusion oder Endozytose in die Wirtszelle ein. Darauffolgend wird das Nukleokapsid in das Zytoplasma abgegeben und über zytoskelettale Strukturen zum Zellkern transportiert. Unmittelbar nach der DNA-Injektion in den Zellkern schließt sich die kaskadenartige Synthese von viralen Proteinen in einer bestimmten zeitlichen Abfolge an (3, 5, 6). Der Beginn der Expressionskaskade wird durch einen Promotor, den sogenannten *Major Immediate Early* (MIE) Promotor, initiiert und ist unabdingbar für den weiteren Verlauf der viralen Genexpression und

Replikation. Die beteiligten MIE Proteine inhibieren unter anderem die intrinsische Immunabwehr und agieren als Transaktivatoren und Autostimulatoren für die Expression weiterer viraler *immediate early* (IE) Gene bis zu 2 Stunden (h) nach Infektion (3, 7-10). IE-Proteine stimulieren anschließend die Genexpression viraler *early* (E) Gene (< 24 h), die vor allem für virale Enzyme codieren, welche für die DNA-Replikation essentiell sind und daher auch als Zielstrukturen für bisher zugelassene antivirale Therapeutika dienen (3, 5, 6, 11). Insbesondere sind hier pUL97 als Kinase, pUL54 als DNA-Polymerase sowie pUL51, pUL52, pUL56, pUL77, pUL89, pUL93, pUL104 als Proteine des Terminase-Komplexes zu nennen (12). Als Letztes folgt die Expression von *late* (L) Genen (> 24 h), die überwiegend für strukturelle Virusproteine codieren (3, 5, 6, 11). Nachfolgend schließt sich der Zusammenbau des Kapsids mit Translokation der viralen DNA in das Kapsid an. Die reifen Kapside werden daraufhin in das Zytoplasma abgegeben, wo Tegumentation, Umhüllung und Akkumulierung unter der Bildung eines *Assembly Complex* erfolgen, bevor die reifen Viruspartikel aus der infizierten Zelle in den Extrazellulärraum entlassen werden und schließlich die Lyse der Wirtszelle stattfindet (3).

Ein wichtiger Pathogenitätsfaktor des HCMV ist die Etablierung der viralen Latenz im menschlichen Wirt mit der Möglichkeit einer Reaktivierung aus Latenz-Reservoirs. Dabei spielt die Suppression des MIE-Promotors für den Übergang in die latente Form und wiederum die Reaktivierung des MIE-Promotors mit folgender Expressionskaskade für den Übergang in den lytischen Zyklus eine wichtige Rolle. Bisher wurden Vorläuferzellen der myeloischen Zellreihe als Haupt-Reservoir für latente HCMV-Formen identifiziert (2, 5, 13-15).

1.1.3 Epidemiologie

Das HCMV ist ein ubiquitär verbreitetes Virus, dessen Seroprävalenz weltweit ca. 83% beträgt. Die höchste Seroprävalenz liegt in Ländern des östlichen Mittelmeerraumes (90%) und die niedrigste in der europäischen WHO-Region (66%) vor (16). In Deutschland sind etwa 56,7% der erwachsenen Population und 27,4% der Kinder im Alter von 1-17 Jahren HCMV-seropositiv. Demnach ist eine Zunahme der Prävalenz mit steigendem Alter zu verzeichnen (2, 17-19). Zudem werden ein niedriger sozioökonomischer Status, der Kontakt mit Körpersekreten von Kindern (Urin, Speichel) und das weibliche Geschlecht mit einer erhöhten HCMV-Seropositivität innerhalb der erwachsenen Population assoziiert (1, 18, 20, 21).

Bei Kindern wurden als Einflussfaktoren für eine HCMV-Seropositivität unter anderem ein Migrationshintergrund, das Stillen mit Muttermilch und der Besuch einer Kinderbetreuung vor dem 3. Lebensjahr identifiziert (17).

1.1.4 Transmission

Eine HCMV-Übertragung kann in jedem Alter horizontal über Blut und Körperflüssigkeiten wie Urin, Speichel, Vaginalsekret, Sperma, Tränenflüssigkeit oder auch solide Organ- und allogene Stammzelltransplantationen (SOT, SZT) erfolgen. Ferner ist präpartal eine vertikale Transmission über die Plazenta, peripartal während des Geburtsvorganges oder postpartal beim Stillen über die Muttermilch von der Mutter auf das Kind möglich (2, 5, 22-24). Eine initiale Infektion erfolgt meist über die Epithelzellen der Haut, des Respirationstraktes oder des Gastrointestinaltraktes und verbreitet sich dann über die Infektion von Leukozyten innerhalb des gesamten Körpers (2, 22, 25). Eine persistierende Verbreitung ist trotz Immunkompetenz und Latenz im Rahmen einer asymptomatischen Reaktivierung durch Ausschüttung von Viruspartikeln über Körpersekrete, wie z.B. Speichel, Urin und Muttermilch möglich (2, 4, 22, 26-28).

Im Rahmen von SOT und SZT tritt eine HCMV-Infektion als häufigste opportunistische Infektion auf und stellt eine der Hauptursachen für eine erhöhte Morbidität und Mortalität dar (29-32). Das größte Risiko durch eine SOT mit einer schweren HCMV-Erkrankung konfrontiert zu werden besteht durch Primärinfektion, d.h. wenn ein Organ seropositiver Spender*innen (D+) in seronegative Empfänger*innen (R-) transplantiert wird. Nach SZT kommt es in 80% der Fälle hingegen durch eine Reaktivierung des latenten Virus in seropositiven Empfänger*innen zu einer erneuten akuten HCMV-Infektion (5, 33).

1.2 Die HCMV-Infektion

1.2.1 Klinik

Eine HCMV-Infektion kann sich klinisch sehr unterschiedlich darstellen. Die Ausreifung und Funktion des Immunsystems sind hierbei für unterschiedliche Verläufe maßgeblich. Bei immunkompetenten Menschen verläuft eine primäre Infektion mit dem HCMV vorwiegend inapparent. Dennoch werden auch symptomatische Verläufe mit wiederkehrenden grippeartigen Symptomen, wie Fieber, Fatigue und Gliederschmerzen, beschrieben (34). Zudem können sich auch ähnliche Symptome einer leichten

Ausprägung der infektiösen Mononukleose (zervikale Lymphadenopathie, Splenomegalie, Gliederschmerzen) zeigen (2, 35, 36). In äußerst seltenen Fällen kann es bei immunkompetenten Menschen zu einem schwerwiegenden klinischen Bild einer gewebeinvasiven HCMV-Erkrankung mit Organversagen (Endorgankrankheit) kommen (1, 3, 37, 38). Nach einer Primärinfektion etabliert sich bei Immunkompetenz in der Regel eine lebenslange latente Infektion, die durch Schwächung des Immunsystems zu einer erneuten Virusreplikation und möglichen Symptomen führen kann.

Für Menschen mit unreifem, eingeschränkt funktionierendem oder supprimiertem Immunsystem stellt eine Infektion mit dem HCMV eine potentiell lebensbedrohliche Situation dar. Zur Risikogruppe zählen überwiegend HIV-Infizierte, Ungeborene bzw. Neugeborene (insb. Frühgeborene), Menschen mit primären oder sekundären Immundefekten und Transplantatempfänger*innen. Da das HCMV einen sehr breiten Zelltropismus zeigt, können sich in dieser Risikogruppe verschiedene schwerwiegende Erkrankungen multipler Organe durch direkte Zytopathogenität (z.B. Pneumonitis, Enterokolitis, Hepatitis, Encephalitis, Retinitis) mit einhergehenden Spätfolgen manifestieren (2, 39). So kann es mitunter zu einem komplexen Bild einer systemischen HCMV-Erkrankung mit potentieller Todesfolge kommen (4, 5, 40, 41).

Im Rahmen einer kongenitalen Infektion zeigen etwa 5-10 % der Neugeborenen Symptome, z.B. Petechien, Ikterus, Hepatosplenomegalie und Mikrozephalie (24, 42). Bei asymptomatisch infizierten Neugeborenen werden in 5-15 % der Fälle Langzeitfolgen, überwiegend in Form von neurologischen Defiziten, beobachtet. Am häufigsten kommt es dabei zu psychomotorischen Einschränkungen, sensorineuraler Hörschädigung, mentaler Retardierung, Chorioretinitis, Krampfleiden und Zerebralparese (3, 24, 43, 44).

1.2.2 Diagnostik

Heutzutage konzentriert sich die Diagnostik von primären und latenten HCMV-Infektionen hauptsächlich auf den schnellen Nachweis einer HCMV-spezifischen humoralen und zellulären Immunantwort (IgM-/IgG-Antikörper, spezifische T-Zellen) und HCMV-Direktnachweise (HCMV-Nukleinsäuren) mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) (4, 45-47). Der serologische Nachweis von IgG deutet dabei eine latente Infektion an, der IgM-Nachweis gibt einen Hinweis auf ein akutes Infektionsgeschehen. Durch die zusätzliche Bestimmung der Avidität von HCMV-spezifischen IgG-Antikörpern oder der Suche nach neutralisierenden Antikörpern (anti-Glykoprotein B, anti-Glykoprotein H) kann zwischen

einer akuten und länger zurückliegenden HCMV-Infektion zuverlässiger differenziert werden. So sprechen eine niedrige IgG-Avidität und fehlende neutralisierende Antikörper für eine kürzlich (bis vor ca. 3 Monaten) erworbene Infektion (24, 45, 48).

Ist das Immunsystem in seiner Funktion eingeschränkt, z.B. nach SOT und SZT oder bei Neugeborenen, so stellt die serologische HCMV-Antikörperdiagnostik keine zuverlässige diagnostische Methode dar. Man bedient sich daher vor allem des direkten Virusnachweises durch Isolation und Quantifizierung von HCMV-Nukleinsäuren oder des Virus selbst aus Blut, Plasma, Serum, Trachealsekret, Urin, Muttermilch, Liquor und Gewebe (4, 24, 49-52).

1.2.3 Prävention

Um Primärinfektionen und damit die Seroprävalenz von latenten HCMV-Infektionen in der Allgemeinbevölkerung weltweit herabzusetzen, bleibt die Entwicklung eines Impfstoffes weiterhin Priorität. Mittlerweile existieren zwar verschiedene potentielle Lebend- und Totimpfstoffe, jedoch ist bisher keiner dieser Impfstoffe als effektiv genug einzustufen und daher auch nicht zugelassen (2, 3, 53, 54).

Eine allgemeine Präventionsmaßnahme im Krankenhaus ist die Leukozytendepletion von Blutprodukten, um bei Bluttransfusionen mitunter auch das Risiko einer Übertragung von HCMV auf Empfänger*innen zu reduzieren (3, 31, 55, 56).

Als primäre Präventionsstrategie einer HCMV-Infektion im Rahmen einer SOT oder SZT steht die HCMV-IgG-Testung und Risikostratifizierung anhand der Konstellation des Serologiestatus von Spender*in und Empfänger*in vor der Transplantation zur Verfügung (siehe Tab. 1). Das geringste Risiko besteht bei Seronegativität von Spender*in und Empfänger*in (D-/R-), die Umsetzung einer solchen Transplantation ist allerdings häufig nicht realisierbar (3, 45). Für die anderen jeweiligen Risikokonstellationen ergeben sich weitere sekundäre Präventionsstrategien, um einer manifesten HCMV-Erkrankung bei Seropositivität vorzubeugen. Hierzu zählen die universelle Prophylaxe (dreimonatige antivirale Medikation in halber therapeutischer Dosis) und die präemptive Therapie (wöchentliches bis zweiwöchentliches Monitoring durch Bestimmung von HCMV-DNA und Einleitung einer Therapie bei Überschreitung bestimmter Grenzwerte). Beide Maßnahmen weisen Vor- und Nachteile auf und müssen individuell in Hinblick auf Risikokonstellation, Transplantationsform, Kliniklogistik und Kosten abgewogen werden. (45, 52, 57, 58).

Tab. 1: Risikoklassifikation bei Organ- und Stammzelltransplantation (SOT, SZT) anhand des HCMV-Serologiestatus von Spender*in/Empfänger*in, modifiziert nach (45).

HCMV-IgG-Serologiestatus		Risikoklassifikation	
Spender*in (D)	Empfänger*in (R)	SOT	SZT
-	-	niedrig	niedrig
-	+	mäßig	hoch*
+	+	mäßig	mäßig
+	-	hoch	mäßig*

* Kontroverse Studienlage zum Einfluss des Serologiestatus von Spender*innen (59-62)

SOT = Organtransplantation, (solide Organtransplantation); SZT = allogene Stammzelltransplantation

1.2.4 Therapie

Eine medikamentöse Therapie einer HCMV-Infektion ist bei immunkompetenten Menschen nur in sehr seltenen Fällen bei Auftreten von schweren Symptomen indiziert. Nach SOT oder SZT hingegen werden, wie eben beschrieben, Virostatika auch im Falle einer asymptomatischen Infektion als Prophylaxe oder präemptive Therapie eingesetzt (2-4, 52, 63). Für das Management symptomatischer HCMV-Infektionen nach Transplantationen liegen Therapieempfehlungen von Fachgesellschaften vor (64, 65).

1.3 Virostatika

Alle bisher zugelassenen antiviralen Therapeutika hemmen die virale Replikation. Derzeit sind vier verschiedene Medikamente für die Therapie und Prophylaxe einer HCMV-Infektion zugelassen. Die Wirkung der drei gängigsten Virostatika Ganciclovir (GCV), Cidofovir (CDV) und Foscarnet (FOS) basiert auf der Verlangsamung oder Terminierung der viralen Replikation durch Interaktion mit der UL54-DNA-Polymerase. Für die Wirkung von GCV ist außerdem die UL97-Kinase als initial aktivierendes Enzym essentiell (2, 3, 66, 67).

1.3.1 Ganciclovir (GCV) und Valganciclovir (VGCV)

Als Goldstandard in der Therapie und Prophylaxe von HCMV-Infektionen bzw. Erkrankungen gilt Ganciclovir (GCV), ein Guanodin-Analogon, welches seit 1989 zugelassen (68) ist. GCV kann nur als GCV-Triphosphat die virale Replikation inhibieren, weshalb es zunächst dreimalig phosphoryliert werden muss. Die erste Phosphorylierung

findet durch die virale UL97-Kinase statt, der zweite und dritte Phosphorylierungsschritt werden durch zelluläre Kinasen katalysiert (siehe Abb. 1). GCV-Triphosphat wird schließlich in den wachsenden DNA-Strang als Guanosinanalogon bei der Replikation aufgenommen, was die weitere Polymerisation durch die virale UL54-Polymerase und damit die virale Replikation deutlich verlangsamt und ggf. terminiert (62, 67-69). Die Neutropenie wird als häufigste und bedeutsamste Nebenwirkung beschrieben, weitere Nebenwirkungen sind beispielsweise Neurotoxizität, Anämie und Thrombozytopenie, bis hin zu einer Knochenmarkhypoplasie (2, 67, 70). Die Applikation von GCV erfolgt in der Regel intravenös für initial 14 Tage (d) mit 5 mg/kg/d. Bei Nierenfunktionsstörungen wird die Dosis dementsprechend angepasst (2, 67).

Valganciclovir (VGCV) ist ein Prodrug von GCV, welches in oraler Applikationsform eine bessere Bioverfügbarkeit als orales GCV besitzt und sich dadurch vor allem für eine fortführende Erhaltungstherapie eignet. Im Gastrointestinaltrakt und der Leber wird VGCV zu GCV konvertiert und entfaltet anschließend seine Wirkung (2). Die Wirkstärke entspricht der des intravenös verabreichten GCV, Nebenwirkungen kommen seltener vor und fallen in der Regel milder aus (70).

1.3.2 Cidofovir (CDV)

Cidofovir (CDV) ist ein Cytosin-Analogon und wird vor allem zur Therapie HCMV-induzierter Retinitiden bei AIDS-Patienten und Infektionen mit HCMV-Stämmen, die aufgrund von Mutationen in UL97-Gensequenzen resistent gegenüber GCV sind, angewandt (62, 67). CDV inhibiert als Nukleosid-Analogon die UL54-codierte DNA-Polymerase durch Inkorporation in die virale DNA. Im Gegensatz zu GCV liegt CDV jedoch bereits monophosphoryliert vor und wird von zellulären Kinasen zur aktiven Form phosphoryliert. So kann CDV unabhängig von der viralen UL97-Kinase seine Wirkung entfalten. Eine häufige Nebenwirkung ist die Nephrotoxizität, die sich klinisch durch Proteinurie und Glucosurie äußert und häufig therapielimitierend ist (67, 70).

1.3.3 Foscarnet (FOS)

Foscarnet (FOS) ist ein anorganisches Pyrophosphat-Analogon, welches vorwiegend als alternatives Virostatikum bei GCV-Resistenz oder zu starker Myelosuppression unter GCV-Therapie verwendet wird. Die Wirkung von FOS basiert auf einer direkten reversiblen Inhibition der viralen UL54-DNA-Polymerase durch Besetzung der

Pyrophosphat-Bindungsstelle (siehe Abb. 1). Folglich wird die Abspaltung von Pyrophosphat von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTP) während der Polymerisation verhindert und die virale Replikation terminiert (2, 62, 70). Als bedeutsame Nebenwirkungen sind insbesondere die Nephrotoxizität, Hypokalzämie, Elektrolytstörungen und genitale Ulzerationen bekannt. FOS wird bei normaler Nierenfunktion mit einer Initialdosis von 3x 60 mg/kg/d für 14 d und einer Erhaltungsdosis von 90-120 mg/kg/d intravenös appliziert (2, 67, 70).

1.3.4 Aciclovir (ACV)

Aciclovir (ACV) ist ein Nukleosid-Analogon, welches in seiner aktiven Form, dem ACV-Triphosphat, in den wachsenden DNA-Strang aufgenommen wird und zur Termination der Replikation führt (71). Es wird in manchen Zentren für die Prophylaxe und Therapie von HCMV-Infektionen eingesetzt, dient aber in der Regel im Rahmen von Transplantationen zur Therapie von Herpes-Simplex- und Varizella-Zoster-Virus-Infektionen. Die häufigste Nebenwirkung ist die Nephrotoxizität (70).

1.3.5 Neue Virostatika

Aufgrund schwerwiegender Nebenwirkungen, Toxizitätserscheinungen und zunehmender Resistenzentwicklung gegenüber den oben genannten Virostatika werden neue Therapeutika mit anderen Zielstrukturen und Nebenwirkungsprofilen entwickelt (2, 62, 70, 72). Letemovir ist bereits seit 2018 in Deutschland für die risiko-adaptierte Prophylaxe einer HCMV-Reaktivierung bei erwachsenen seropositiven Empfänger*innen nach SZT zugelassen. Es schränkt die Vermehrung des Virus durch Inhibition des DNA-Terminasekomplexes (codiert durch UL56- und UL89-Gen) ein (2, 66, 70). Weitere Wirkstoffe wurden bereits in klinischen Studien evaluiert (Maribavir, Filociclovir, Brincidofovir) (73-76). Innovative antivirale Therapeutika, deren Angriffspunkte Strukturen des frühen Infektionsstadiums sind oder welche die Inhibition der intrinsischen Immunabwehr verhindern sollen (z.B. durch Beeinflussung von MIE-Proteinen), befinden sich im Entwicklungsprozess (12, 75).

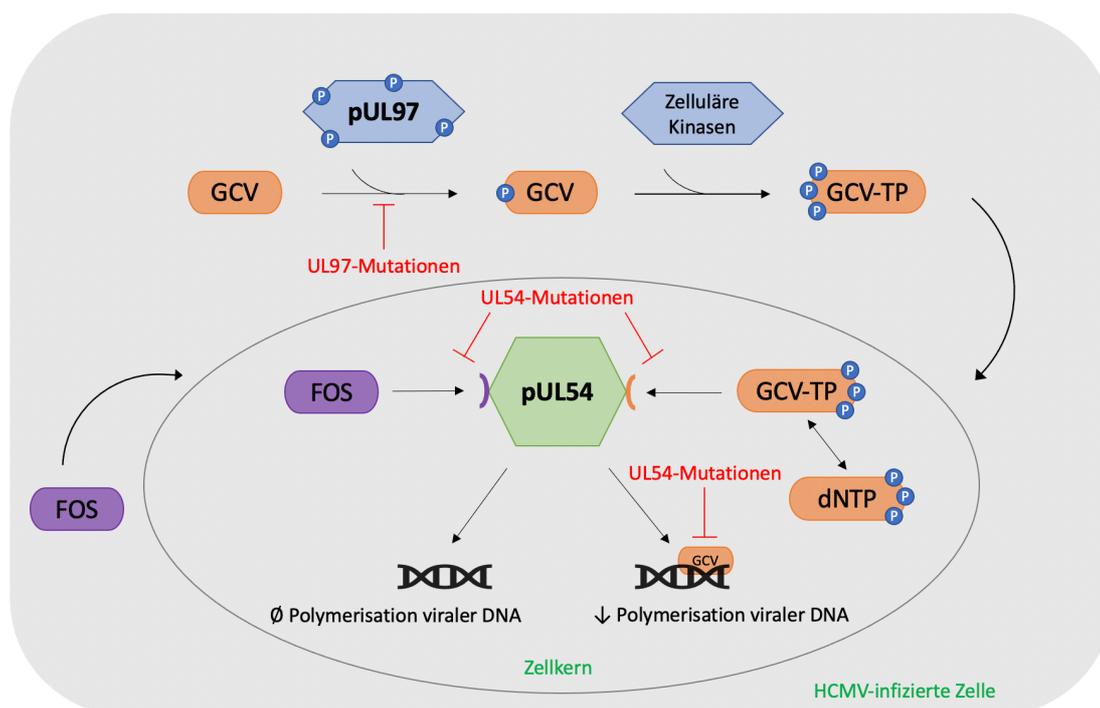


Abb. 1: Wirkungsweise von GCV und FOS

Die Wirkungsweisen von GCV als Goldstandard und FOS als alternatives Virostatikum sind schematisch dargestellt. ↓ = Verlangsamung der DNA-Polymerisation, ∅ = Abbruch der DNA-Polymerisation, ⊥ = Inhibition durch Mutationen im UL54- und UL97-Gen (nähere Beschreibung dazu siehe Abschnitt 1.4.1, 1.4.2); dNTP = Desoxynukleosidtriphosphat(e); FOS = Foscarnet; GCV = Ganciclovir; GCV-TP = Ganciclovir-Triphosphat; pUL54 = UL54-Polymerase; pUL97 = UL97-Kinase // Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an (67, 68)

1.4 Hintergrund und Analyse von Virostatika-Resistenzen

Durch die umfangreiche Verwendung von Virostatika zur Prophylaxe und präemptiven Therapie einer HCMV-Erkrankung konnten Morbidität und Mortalität bei Transplantationspatient*innen in den letzten Jahren zwar teilweise gesenkt werden, gleichzeitig führen diese Präventionsstrategien jedoch auch zur Selektion und Entwicklung resistenter Viruspopulationen (29, 59, 68). Risikofaktoren für die Entwicklung einer Virostatika-Resistenz sind neben der Immunsuppression eine Dauer der virostatischen Therapie über > 3 Monate, inadäquate Dosierung und Applikation des Virostatikums sowie Therapieunterbrechungen bei zu starken Nebenwirkungen, die eine persistierende Replikation des HCMV begünstigen (62, 68, 77-79). Molekularbiologischer Hintergrund resistenter HCMV-Stämme sind Mutationen von Gensequenzen mit Veränderung in der Aminosäurefolge der viralen Proteine bzw. Enzyme, die als Zielstrukturen der Virostatika definiert sind. Eine besondere Rolle spielen daher

Genmutationen in den ORF UL97 und UL54, die für die virale UL97-Phosphotransferase und die UL54-DNA-Polymerase codieren, welche Zielstrukturen der Virostatika GCV, VGCV, CDV und FOS sind (62, 67, 68, 80), (siehe Abb. 1).

Der Verdacht einer refraktären HCMV-Infektion kann bei persistierender oder steigender Viruslast unter mindestens zweiwöchiger regelhafter Therapie mit einem Virostatikum geäußert werden (65, 77). Darauffolgend sollte eine Virostatika-Resistenz zunächst durch genotypische Resistenztestung (Sequenzierung) auf bekannte resistenzvermittelnde Mutationen sowie weiterführend durch phänotypische Resistenztestung diagnostisch abgeklärt werden (64, 65, 68, 77, 81).

1.4.1 Mutationen im UL97-Gen

UL97 wurde 1992 als ORF, der für die HCMV-Phosphotransferase (UL97-Kinase) codiert, identifiziert (82). Die UL97-Phosphotransferase (UL97-Kinase) ist ein Serin-Threonin-Enzym, das die Fähigkeit zur Autophosphorylierung besitzt. Es wird in der *early* und *late* Replikationsphase exprimiert und ist an vielen Prozessen der viralen Morphogenese, Reifung und Replikation durch Phosphorylierung von viralen und zellulären Proteinen beteiligt (83-86). Der UL97-Genabschnitt kann nochmals in funktionelle Subdomänen eingeteilt werden (62, 87), (siehe Abb. 2A). Häufig beschriebene Mutationen im UL97 Gen, die eine GCV-Resistenz durch Verminderung der Phosphorylierung von GCV bedingen (siehe Abb.1), liegen verdichtet in Clustern der Kinase-Domäne zwischen den Codons 460, 520 und 590 bis 607 vor (siehe Abb. 2B). Typische Punktmutationen sind beispielsweise M460V/I, H520Q, C592G, A594V, L595S und C603W (62, 67-69). Virale Funktionen der UL97-Kinase, wie z.B. die Replikation, werden nicht oder nur wenig durch die speziell lokalisierten resistenzvermittelnden Mutationen in Clustern beeinflusst (69, 88, 89). Es scheint daher plausibel, dass in klinischen Isolaten häufiger und primär (in 85-95% der GCV-Resistenzfälle) UL97-Resistenz-Mutationen, meist als Punktmutationen oder Codon-Deletionen, gefunden werden (68, 79).

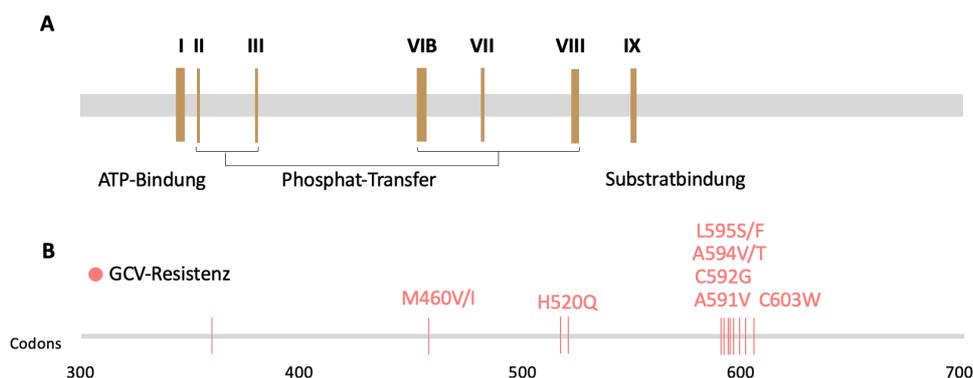


Abb. 2: Struktureller Aufbau und Mutationen von UL97

(A) Funktionelle Regionen (Domänen) des UL97-Gens der viralen UL97-Kinase. Codons der Regionen: I: 338-345, II: 355, III: 380, IVB: 453-462, VII: 481-483, VIII: 520-527, IX: 574-579 (B) ausgewählte resistenzvermittelnde Mutationen gegenüber GCV in UL97. ATP = Adenosintriphosphat // Quelle: Eigene Darstellung, modifiziert nach (62, 68, 90)

1.4.2 Mutationen im UL54-Gen

Der UL54-Genabschnitt codiert für die virale DNA-Polymerase und wird in der *early* Phase des Replikationszyklus exprimiert. Die UL54-Polymerase besitzt eine Exonuklease- und eine Polymerase-Funktion (62, 67, 68). Diese spiegeln sich als einzelne Regionen in der Proteinstruktur wider (siehe Abb. 3A). Veränderungen von Aminosäuresequenzen in UL54 können in einer Virostatika-Resistenz resultieren, indem sie entweder eine Bindung des Virostatikums an die DNA-Polymerase und den Einbau des Nukleosid-Analogons verhindern oder eine Entfernung des inkorporierten Nukleosid-Analogons hervorrufen (siehe Abb.1), (62, 67, 68, 89). Solche Mutationen treten meistens zusätzlich zu bereits bestehenden UL97-Mutationen nach einer längeren Behandlungszeit von ca. 3 Monaten mit GCV auf und können in der Kombination zu einem synergistischen Effekt hinsichtlich der Stärke der Resistenzvermittlung führen (68, 80, 91, 92). Ein resistenter Phänotyp kann allerdings auch durch weitere multiple Mutationen und Polymorphismen kompensiert werden (67, 93). Im Gegensatz zu Mutationen in UL97 sind resistenzvermittelnde UL54 Mutationen fast über das gesamte Gen verteilt zu finden, überwiegend jedoch zwischen Codon 300 und 1000 (Abb. 3B). Zudem werden sehr viele Polymorphismen beschrieben, die nicht resistenzassoziiert sind. (67, 68).

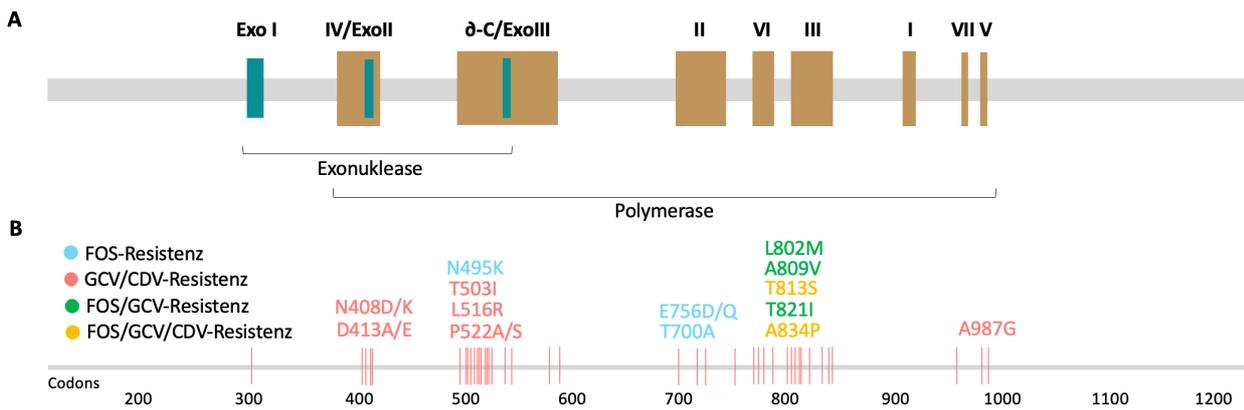


Abb. 3: Struktureller Aufbau und Mutationen von UL54

(A) Funktionelle Regionen (Domänen) des UL54-Gens der viralen UL54-Polymerase. Codons der Regionen: I: 295-312, IV/ExoII: 379-421 (ExoII: 404-418), δ -C/ExoIII: 492-588 (ExoIII: 533-545), II: 696-742 VI: 771-790, III: 805-845, I: 905-919, VII: 962-970, V: 978-988. (B) Ausgewählte resistenzvermittelnde Mutationen. Mutationen, die eine Resistenz gegenüber GCV und CDV vermitteln, sind vorwiegend in der Region V (Bindungsstelle der Virostatika) und der Exonuklease-Domäne (Korrekturlesefähigkeit) lokalisiert. FOS-Resistenz-assoziierte Mutationen finden sich überwiegend zwischen der Region II und III (Bereich der Pyrophosphat-Bindungsstelle). Mutationen zwischen 750 und 1000 bedingen eine gemischte Virostatika-Resistenz (GCV, CDV, FOS). CDV = Cidofovir; FOS = Foscarnet; GCV = Ganciclovir // *Quelle: Eigene Darstellung, modifiziert nach (62, 68, 90)*

1.4.3 Genotypische Resistenztestung

Bei klinischem Verdacht auf eine refraktäre HCMV-Infektion kann über das Plasma von Patient*innen nach Mutationen in den oben beschriebenen HCMV-Genen gesucht und eine Virostatika-Resistenz mittels PCR und anschließender Gensequenzierung laborchemisch nachgewiesen werden (77, 94). Derzeit stehen mehrere Gensequenzierungstechnologien zur Verfügung. Neben der Didesoxysequenzierung nach Sanger existieren Technologien wie das Next Generation Sequencing (NGS) (95, 96), die im Vergleich zur Sanger-Sequenzierung eine höhere Sensitivität besitzen. So können auch Subpopulationen mit resistenzvermittelnden Mutationen, die weniger als 20-30% ausmachen, detektiert werden. Bisher sind diese Methoden jedoch seltener verfügbar und mit höheren Kosten verbunden (77, 78, 90, 95, 96).

Durch genotypische Resistenztestung ist es möglich, innerhalb kurzer Zeit (meist innerhalb von 3 Tagen) resistenzvermittelnde Mutationen nachzuweisen, die virostatika Therapie demnach anzupassen und Toxizitätserscheinungen von unzureichend wirkenden Virostatika zu vermeiden. Werden jedoch neue und noch unbeschriebene Mutationen entdeckt, so kann ihr Einfluss auf die Wirksamkeit eines Virostatikums nur durch phänotypische Resistenztestung eruiert werden (67, 68, 97).

1.4.4 Phänotypische Resistenztestung

Die phänotypische Resistenztestung von klinischen HCMV-Isolaten eignet sich aufgrund des mehrwöchigen Zeitaufwands nicht als klinisches Diagnostikum. Sie ist dennoch als retrospektive phänotypische Evaluation von neu aufgetretenen Mutationen relevant, da sie die Datenbasis erweitert, welche eine zuverlässige Unterscheidung von resistenzvermittelnden Mutationen und Polymorphismen im Rahmen der genotypischen Resistenztestung ermöglicht (68, 77, 90, 97-100).

Die Phänotypisierung ist besonders wichtig, wenn neue Mutationen im Zusammenhang einer refraktären HCMV-Infektion detektiert werden oder in spezifischen Codons lokalisiert sind (Resistenz-Hot Spots), für welche bereits einige resistenzvermittelnde Mutationen beschrieben sind (79).

1.4.4.1 Rekombinante Phänotypisierung

Klinische HCMV-Isolate setzen sich meistens aus mehreren viralen Subpopulationen mit verschiedenen Mutationen und Polymorphismen zusammen (Heterogenität), weshalb die phänotypische Charakterisierung von einzelnen Mutationen oder Mutationskombinationen nur durch Generierung von HCMV-Mutanten mit definiertem Genotyp möglich ist (67, 68, 101). Da die Gewinnung eines HCMV-Stammes mit definiertem Genotyp aus der Zellkultur über die Plaque-Aufbereitung (plaque purification) sehr viel Zeit in Anspruch nimmt und häufig nicht möglich ist, bedient man sich heutzutage der rekombinanten Phänotypisierung. Dabei wird die zu phänotypisierende Mutation in einen Virostatika-sensitiven HCMV-Wildtyp-Stamm eingefügt, dessen Genom als Bakteriell-artifizielles Chromosom (BAC) kloniert in *Escherichia coli* (*E. coli*) vorliegt und über verschiedene Methoden modifiziert und amplifiziert werden kann (67, 69, 102, 103). Nach der erfolgreichen Rekombination folgt die Transfektion der BAC-DNA in humane Zellen, um infektiöses Virus in der Zellkultur zu rekonstituieren und phänotypische Resistenztestungen anzuschließen. Die Ergebnisse lassen eine direkte Genotyp-Phänotyp-Korrelation zu, wodurch es letztlich möglich wird, eine Aussage über den Einfluss der Mutation oder Mutationskombination (Genotyp) auf die Virusvermehrung oder die Virostatika-Suszeptibilität (Phänotyp) zu treffen (67, 68, 90, 104).

1.4.4.2 In vitro-Resistenzassays

Ist eine HCMV-Mutante erfolgreich in der Zellkultur rekonstituiert worden, kann der Phänotyp hinsichtlich Resistenzverhalten durch verschiedene Assays untersucht werden. Ziel der jeweiligen Assays ist es, die Konzentration eines Virostatikums zu

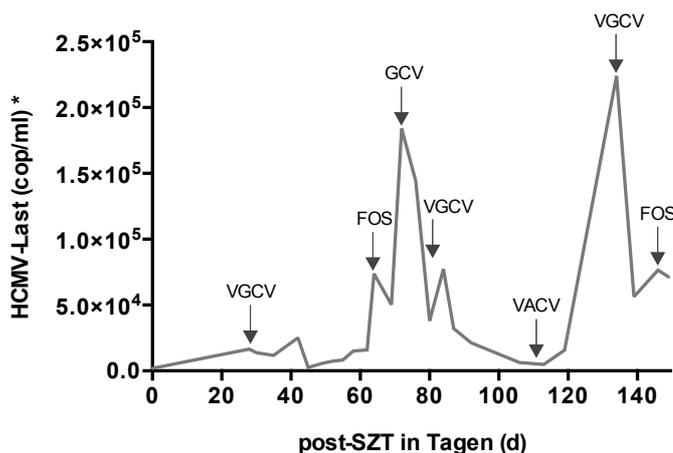
bestimmen, welche die Virusvermehrung in vitro zu 50% inhibiert. Diese halbmaximale effektive Konzentration wird EC_{50} genannt. Zur Vergleichbarkeit werden ein sensitiver HCMV-Stamm (Wildtyp-Referenz) und bekannte resistente HCMV-Stämme (Kontrollen) mitgeführt und die EC_{50} -Ratio (EC_{50} Mutante \div EC_{50} Wildtyp) angegeben (67, 68).

Als Goldstandard für phänotypische Resistenztestungen ist weiterhin der Plaque-Reduktions-Assay (PRA) definiert. Dieser beruht auf der mikroskopischen Auszählung von sichtbaren Plaques, die einen Zusammenschluss von infizierten Zellen darstellen. Die EC_{50} ist hier als Virostatika-Konzentration definiert, durch die 50% weniger Plaques gebildet werden als ohne Virostatikum (67, 68, 105, 106). Nachteile dieser Methode sind u.a. der mehrwöchige Zeitaufwand bis zur Bildung von sichtbaren Plaques und die eingeschränkte Reliabilität des Assays durch die Subjektivität der Plaqueauszählung (68, 107). Es existieren zudem nur wenige Laboratorien, die diese Methode durchführen (79). Aufgrund der genannten Nachteile werden immer häufiger vereinfachte PRA-Protokolle sowie mehrere alternative Methoden für die phänotypische Resistenztestung beschrieben, wie z.B. die Verwendung von Fluoreszenz-Reporter-Genen oder die real-time PCR, welche die phänotypische Resistenztestung objektivieren und beschleunigen (68, 91, 105, 108, 109). Auch in dieser Arbeit wurde eine alternative Methode für die phänotypische Resistenztestung etabliert, welche eine Virostatika-abhängige Titerreduktion (Yield Reduction) basierend auf einer durchflusszytometrischen Immunotitration objektiv analysiert (siehe Abschnitt 2.2.6).

1.5 Klinischer Fall

Bei einem 2-jährigen Patienten trat in der Folge einer Akuten Myeloischen Leukämie (AML) des Typs M5 (Akute Monoblasten-/Monozytenleukämie) und nachfolgender SZT eine HCMV-Reaktivierung mit Therapierefraktärität auf. Die SZT erfolgte in HCMV-Risiko-Serokonstellation (D-/R+; siehe Tab. 1) mit nachfolgender VACV-Prophylaxe. Am Tag vor der Entlassung (Tag 28 nach SZT) wurde eine HCMV-Last von 16.500 cop/ml im Plasma detektiert. Daraufhin wurde eine virostatische Therapie mit VGCV begonnen. Hierunter kam es nach zwei Tagen zu einem stabilen Befund von 13.800 cop/ml. Im weiteren Verlauf erfolgten bei rezidivierenden Erhöhungen der HCMV-Last mehrere Umstellungen der Virostatika-Therapie (siehe Abb. 4). Es stellte sich der Verdacht auf eine Virostatika-Resistenz ein, weshalb erstmalig an Tag 76 nach SZT eine UL97-Sequenzierung durchgeführt wurde. Hierbei konnte keine resistenzvermittelnde Mutation

gefunden werden. Eine weitere genotypische Resistenztestung zeigte in UL54 bekannte Polymorphismen (S655L, N685S, A885T, N898D) (68) und zwei unbeschriebene Mutationen (N855I und F861Y) in der Nähe von häufig resistenzassoziierten Regionen - sogenannten Resistenz-Hot Spots (siehe Abb. 5). Es folgte die Virusisolierung und eine anschließende phänotypische Resistenztestung des Isolats durch das Konsiliarlabor am Institut für Medizinische Virologie des Universitätsklinikums Tübingen. Dort wurden eine hochgradige GCV-Resistenz und eine FOS-Resistenz nachgewiesen.



* PCR Labor Berlin: Nachweisgrenze HCMV-DNA im Plasma: 750 cop/ml

Abb. 4: HCMV-Last des Patienten nach allogener Stammzelltransplantation (SZT)

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der gemessenen HCMV-Last im Plasma. 28. d nach SZT = Start der Virostatika-Therapie. Pfeile zeigen Zeitpunkte der therapeutischen Intervention mit verschiedenen Virostatika an. cop/ml = Kopien pro ml; FOS = Foscarnet; GCV = Ganciclovir; PCR = Polymerasekettenreaktion; post-SZT = nach allogener Stammzelltransplantation; VACV = Valaciclovir; VGCV = Valganciclovir // Quelle: Eigene Darstellung, Daten: Labor Berlin

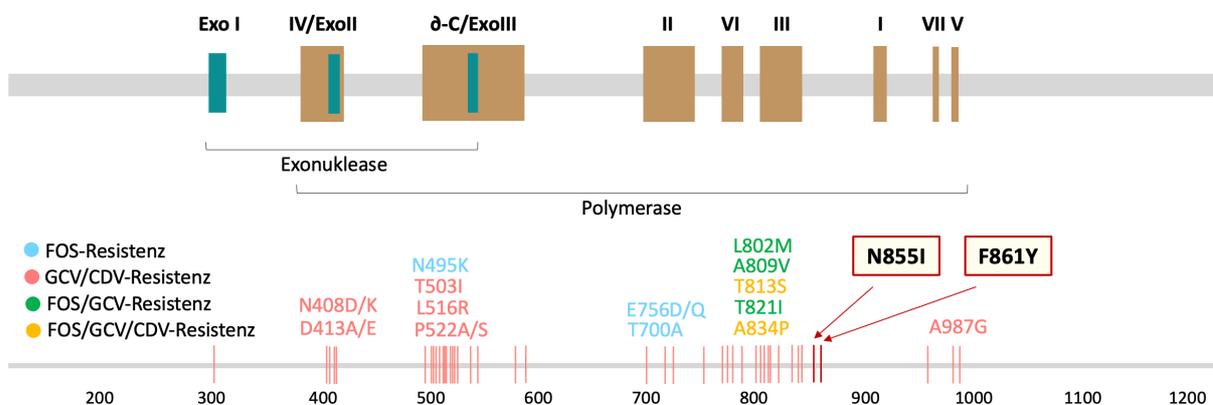


Abb. 5: Lokalisation der unbeschriebenen Mutationen eines klinischen HCMV-Isolats in UL54

Zwei neue unbeschriebene Mutationen (N855I, F861Y) wurden im UL54-Gen im Rahmen der genotypischen Resistenztestung per Sanger-Sequenzierung detektiert. Sie lassen sich in der Nähe von bekannten resistenzvermittelnden Mutationen lokalisieren (dunkelrote Pfeile und Striche). // Quelle: Eigene Darstellung, modifiziert nach (62, 68, 90)

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Eine klinisch apparente HCMV-Infektion ist bis heute als eine der bedeutendsten Komplikationen für Menschen mit eingeschränkter Immundefunktion anzusehen. Sie stellt bei verschiedenen Grunderkrankungen und insbesondere auch nach solider Organ- oder allogener Stammzelltransplantation (SOT, SZT) bei Erwachsenen und Kindern einen verlaufs- und prognosebestimmenden Faktor dar (29, 30, 32, 68). Obwohl mehrere Virostatika für die Behandlung zur Verfügung stehen, sind Nebenwirkungen respektive Toxizitätserscheinungen und zunehmende Resistenzentwicklungen therapielimitierend. Entscheidend für die Auswahl einer empirischen virostatischen Therapie bei refraktärer HCMV-Infektion¹ ist die schnelle und sichere Identifikation resistenzvermittelnder Mutationen im Rahmen der genotypischen Resistenztestung. Dem ist jedoch vorausgesetzt, dass Mutationen bereits phänotypisch beschrieben worden sind. Werden neue unbeschriebene Mutationen in resistenzassoziierten Genen detektiert, bedarf es einer phänotypischen Charakterisierung dieser Mutationen, welche publizierte Listen bzw. die bestehende Datenbank resistenzvermittelnder Mutationen weiter vervollständigen (68, 97, 100).

Ziel dieser Arbeit war es, die im klinischen HCMV-Isolat durch Gensequenzierung detektierten unbekannt Mutationen in der Nähe von resistenzassoziierten Regionen des Gens UL54 (siehe Abb. 5) unter Beantwortung folgender Fragen phänotypisch zu beschreiben:

1. Beeinflussen die UL54-Mutationen N855I und F861Y (einzeln und in Kombination) die Replikation der Viruspopulation?
2. Vermitteln die UL54-Mutationen N855I und F861Y (einzeln und in Kombination) eine Resistenz gegenüber gängigen Virostatika (GCV und FOS)?

¹ Steigende HCMV-Virämie nach ≥ 2 Wochen virostatischer Therapie in ausreichender Dosierung (77).

Auf Grundlage der gefundenen Mutationen im klinischen HCMV-Isolat des beschriebenen Patienten wurden Virusmutanten über die BAC-Technologie mit anschließender Transfektion in humane Zellen generiert und in Zellkultur hinsichtlich ihres Wachstums- und Resistenzverhaltens untersucht. Die phänotypische Resistenztestung erfolgte mit einem neu etablierten Titer-Reduktions-Assay per durchflusszytometrischer Immunotitration (TRA) und wurde den Ergebnissen eines im Konsiliarlabor Tübingen durchgeführten PRA (Goldstandard) gegenübergestellt. Daraus ergaben sich weitere Fragestellungen für diese Arbeit:

3. Korrelieren die Ergebnisse des neu etablierten Titer-Reduktions-Assays per durchflusszytometrischer Immunotitration (TRA) mit den Ergebnissen des extern durchgeführten Plaque-Reduktions-Assays (PRA)?
4. Korreliert der getestete Phänotyp mit dem klinischen Erscheinungsbild einer refraktären HCMV-Infektion?

Für alle Untersuchungen wurden ein Virostatika-sensitiver Wildtyp-Stamm und drei HCMV-Stämme mit häufig beschriebenen resistenzvermittelnden Mutationen als Referenzen mitgeführt (siehe Abschnitt 3, Tab. 19.)

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterien- und Virusstämme

- E. coli-GS1783 (Genotyp: DH10B λ cl857 Δ (cro-bioA) \leftrightarrow araC-PBADl-scel) (110) mit HCMV-TB40-BAC4 (Wildtyp) aus TB40/E (111)
erhalten von: Jens von Einem, Universitätsklinikum Ulm, Deutschland
- HCMV-TB40-BAC4-Wildtyp/Mutanten:
 - o *Referenz* = TB40-BAC4-WT, UL97-M460I, UL54-A987G, UL54-A809V
 - o *Phänotypisierung* = UL54-N855I/F861Y, UL54-N855I, UL54-F861Yselbst generiert mittels en passant Mutagenese, Transfektion und Rekonstitution in humanen Zellen

2.1.2 Humane Zellen

- Primäre humane embryonale Lungenfibroblasten Fi301 (HEL), Passagen 9-18
erhalten von: Institut für Virologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Deutschland

2.1.3 Antikörper

- Anti-CMV-IE1/IE2, AlexaFluor[®]488 MAB810X
(monoklonaler IgG_{2a} Antikörper; Spezies: Maus; 1:2000) für Durchflusszytometrie-basierte Immunotitration
erhalten von Firma: Merck KGaA (Merck Millipore), Darmstadt, Deutschland

2.1.4 Plasmide

- pEPkan-S2, PCR-Template für en passant Mutagenese (112)
erhalten von: Nikolaus Osterrieder (Institut für Virologie, Freie Universität Berlin, Deutschland)
- pcDNA-pp71, Expressionsplasmid
erhalten von: Bodo Plachter (Institut für Virologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Deutschland)

2.1.5 Primer

Alle verwendeten Primer wurden von Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT®; Coralville, Iowa, USA) oder TIB Molbiol Syntheselabor GmbH (Berlin, Deutschland) bezogen.

Tab. 2: Verwendete Mutageneseprimer

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Gen	Größe
UL97 M460I - fw	ATCACCAGTGTCTGTATGCCACTTTGATATTA CACCCATCAACGTGCTCATCGACGTGAATAGGG ATAACAGGGTAATCGATTT	UL97	85 b
UL97 M460I - rv	TCTCGCTGGGGTTGTGCGGGTTCACGTCGATGA GCACGTTGATGGGTGTAATATCAAAGTGGCCAG TGTTACAACCAATTAACC	UL97	84 b
UL54 A987G - fw	GGCCTGAGCATGAAGGGCGTGGATTTGGTGC GC AAGACGGGTTGCGAGTTCGTC AAGGGCGTAGGG ATAACAGGGTAATCGATTT	UL54	85 b
UL54 A987G - rv	CGAGAGGACGTCACGCGTGACGCCCTTGACGAA CTCGCAACCCGTCTTGCGCACCAAATCCGCCAG TGTTACAACCAATTAACC	UL54	84 b
UL54 A809V - fw	GACCCCGTGCGCCGTATGCTGCTCGACAAGGAA CAGATGGTACTCAAAGTAACGTGTAACGTAGGGA TAACAGGGTAATCGATTT	UL54	85 b
UL54 A809V - rv	GCCTGTAAACCGTAGAAAGCGTTACACGTTAC TTTGAGTACCATCTGTTCTTGTGCGAGCGCCAG TGTTACAACCAATTAACC	UL54	84 b
UL54 N855I/F861Y - fw	CGCGACATGCTAGAGCGCACGGCGCGGTTTCATC AAAGACATCTTTTCAGAGCCGTGTTATTTGCACAAT TTTTTTAATCTAGGGATAACAGGGTAATCGATTT	UL54	103 b
UL54 N855I/F861Y - rv	TCCCACTACATAGTCTTCCTGATTA AAAAAATTGTG CAAATAACACGGCTCTGAAAAGATGTCTTTGATGAA CCGCGCCGCCAGTGTTACAACCAATTAACC	UL54	102 b
UL54 N855I - fw	CGCGACATGCTAGAGCGCACGGCGCGGTTTCATC AAAGACATCTTTTCAGAGCCGTGTTTTTTA GGGATAACAGGGTAATCGATTT	UL54	85 b
UL54 N855I - rv	CTGATTA AAAAAATTGTGCAAAAAACACGGCTC TGAAAAGATGTCTTTGATGAACCGCGCCGCCAG TGTTACAACCAATTAACC	UL54	84 b

Fortsetzung Tab. 2: Verwendete Mutageneseprimer

UL54 F861Y - fw	ACGGCGCGGTTTCATCAAAGACAACCTTTTCAGAG CCGTGTTAATTTGCACAATTTTTTTAATCTAGGG ATAACAGGGTAATCGATTT	UL54	85 b
UL54 F861Y - rv	TCCCCTACATAGTCTTCTGATTAATAAATTGTG CAAATAACACGGCTCTGAAAAGTTGGCCAGTGTTAC AACCAATTAACC	UL54	84 b

*rote Markierung = Punktmutation A = Adenin; C = Cytosin; G = Guanin; T = Thymin b: bases fw: forward rv: reverse

Tab. 3: Verwendete Diagnostik- und Sequenzierungsprimer

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Gen	Größe
UL97-seq-nt830 - fw	GCATTGCACCTGTTCCAACG	UL97	20 b
UL97-diagn - fw	CACACCATAACGACAGTGTC	UL97	20 b
UL97_3UTR_rv	GGTTTGTACCTTCTCTGTCCG	UL97	20 b
UL54-nt2340 - fw	CGGAACTGCTCAACAAGTGG	UL54	20 b
UL54-nt3060 - rv	CTTGACTTCATCGAGTGAGAG	UL54	21 b

A = Adenin; C = Cytosin; G = Guanin; T = Thymin b: bases fw: forward rv: reverse

2.1.6 Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben, wurden Chemikalien, Zusätze und Antibiotika für Zellkulturmedien sowie Inhaltsstoffe von Puffern und Lösungen von den Firmen Biochrom AG (Berlin, Deutschland), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland), Lonza Group AG (Basel, Schweiz), Merck KgaA (Darmstadt, Deutschland), Serva Elektrophoresis (Heidelberg, Deutschland), Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland) und Thermo Fisher Scientific (Langenselbold, Deutschland) verwendet.

Tab. 4: Verwendete Chemikalien und Hersteller

Bezeichnung	Hersteller
Agar	United States Biological, Salem, USA
Albumin Fraktion V (Bovine Serum Albumin; BSA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, DE
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, DE

Fortsetzung Tab. 4: Verwendete Chemikalien und Hersteller

6X DNA Gel Loading Dye (Ladepuffer)	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, DE
dNTP-Mix	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, DE
DreamTaq-Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, DE
DreamTaq-Buffer 10X	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, DE
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Biochrom AG, Berlin, DE
Ethanol absolut (≥99,8 %, p.a.)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Ethanol 70%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Ethidiumbromidlösung (1 % in H ₂ O, 10 mg/ml)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Fetal Bovine Serum (FBS)	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
Flüssiger Stickstoff	Linde AG, München, DE
Foscarnet (FOS), 80mM	Pfizer, New York, USA / (Apotheke Charité CVK)
Ganciclovir (GCV), 50mM	Roche, Basel, Schweiz / (Apotheke Charité CVK)
Glycerol	Merck KGaA, Darmstadt, DE
GeneRuler DNA Ladder mix	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, DE
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
0,05% Trypsin/Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, DE

Tab. 5: Verwendete Lösungen/Puffer:

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
1X TBE-Puffer	0,13 M Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan) 45 mM Borsäure 2,5 mM EDTA
Puffer P1	50 mM Tris-HCl pH 8,0 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A
Puffer P2	200 mM NaOH 1% SDS
Puffer P3	3,0 M Kalium-Acetat pH 5,5

2.1.7 Kits

Tab. 6: Verwendete Kits

Bezeichnung	Hersteller
Amaxa™ Basic Nucleofector™ Kit (Primary Fibroblasts)	Lonza Cologne GmbH, Köln, DE
Plasmid DNA Purification Kit (NucleoBond Xtra Maxi)	Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, DE
GeneJet PCR Purification Kit	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, DE
GeneJet Gel Extraction Kit	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, DE

2.1.8 Bakterienmedien/Agarplatten

Tab. 7: Zusammensetzung verwendeter Bakterienmedien und Agarplatten

Medium	Zusammensetzung ^a
Lysogeny broth (LB)-Medium	0,5 % Hefeextrakt, 1 % Trypton/Pepton, 1 % NaCl
LB/Chloramphenicol (Camp)-Medium	LB-Medium + 30 µg/ml Camp
LB/Camp/Kanamycin (Kana)-Medium	LB-Medium + 30 µg/ml Camp + 30 µg/ml Kana
LB/Camp/Arabinose (Arab)-Medium	LB-Medium + 30 µg/ml Camp + 2 % Arab
LB/Camp-Agar	1,5 % Agar in LB/Camp-Medium
LB/Camp/Kana-Agar	1,5 % Agar in LB/Camp/Kana-Medium
LB/Camp/Arab-Agar	1,5 % Agar + 1% Arabinose in LB/Camp-Medium

^a % = (w/v) weight by volume; Massenkonzentration

2.1.9 Zellkulturmedien

Tab. 8: Zusammensetzung verwendeter Zellkulturmedien

Medium	Hersteller	Zusätze
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), 2%	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, DE	2 % fetal bovine serum (FBS) 2 mM L-Alanyl-Glutamin 50 µg/ml Gentamicin
Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM), 10%	Lonza Group AG, Basel, Schweiz	10 % FBS 1,5 mg/ml Natrium-Bicarbonat 1 X nicht-essentielle Aminosäuren 1 mM Natrium-Pyruvat 2 mM L-Alanyl-Glutamin 50 µg/ml Gentamicin

2.1.10 Verbrauchsgegenstände und Geräte

Verbrauchsmaterialien wie Zellkulturschalen, Reaktionsgefäße und Röhrchen wurden von den Herstellern Becton Dickinson (New Jersey, USA), Corning, Inc. (Tewksbury, USA), Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Thermo Fisher Scientific (Langenselbold, Deutschland), TPP Techno Plastic Products AG (Trasadingen, Schweiz) bezogen.

Tab. 9: Verwendete Verbrauchsgegenstände und Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Bakterienbrutschrank	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, DE
BioPhotometer 6131 Spektralphotometer	Eppendorf AG, Hamburg, DE
CO ₂ -Brutschrank, Forma Scientific Model 3250 Water Jacketed Incubator	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, DE
Durchflusszytometer, BD FACS Canto II	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Elektroporator, Amaxa Nucleofector™ II, (AAD-1001N)	Lonza Cologne GmbH, Köln, DE
Elektroporator MikroPulser	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
Elektroporationsküvetten	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
Gefrierschrank (-20 °C)	Robert Bosch GmbH, Gerlingen, DE
Gefrierschränke (-80 °C) Forma 900 Series	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, DE
Horizontale Agarose-Gelelektrophorese-Kammer	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, DE
Horizontales Agarose-Gelelektrophoresesystem Power Pac 300	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
Kamera Canon EOS 600D	Canon Deutschland GmbH, Krefeld, DE
Kühlschrank (4 °C)	Robert Bosch GmbH, Gerlingen, DE
Kühlzentrifuge, GS-15R, F2402	Beckman Coulter, Krefeld, DE
Kühlzentrifuge, Allegra X-12R Centrifuge, Rotor SX4750A	Beckman Coulter, Krefeld, DE
Kühlzentrifuge, Sorvall Lynx 4000 Centrifuge, Rotor F14-6X 250Y und TH13-6X50	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, DE
Laborwaage Ohaus Precision Plus	Ohaus Europe GmbH, Nänikon, Schweiz
Lichtmikroskop, Olympus CK2	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, DE
Mikroskop Zeiss Axio Vert. A1	Carl Zeiss AG, Oberkochen, DE
Mikrowelle	Robert Bosch GmbH, Gerlingen, DE
Neubauer-Zählkammer	Laboroptik Ltd, United Kingdom

Fortsetzung Tab. 9: Verwendete Verbrauchsgegenstände und Geräte

NanoDrop ND-1000-UV/Vis-Spektralphotometer	Peqlab Biotechnologies GmbH, Darmstadt, DE
PCR-Thermocycler LifeTouch	Hangzhou Bioer Technology Co. Ltd. (BIOR), Hangzhou, China
Pipettierhelfer, Pipettus akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, DE
Quarzküvetten	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
Schüttelinkubator, New Brunswick G24 incubator shaker	New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, USA
Schüttelinkubator, New Brunswick Innova 4300	New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, USA
Schüttelwasserbad	GFL-Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, DE
Sicherheitswerkbank, Heraeus LaminAir HB2448	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, DE
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Tischzentrifuge, MicroMax, IEC 851-Rotor	International Equipment Company, Chattanooga, USA
UV-Stralinker 2400	Stratagene, San Diego, Kalifornien, USA
Vortexer, Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Wasserbad	GFL-Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, DE
Zentrifuge (Zellkultur) Centrifuge 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg, DE

2.1.11 Software

Tab. 10: Verwendete Software (Programme)

Bezeichnung	Hersteller
BioStep Argus X10, Versio 7.10.15	Biostep Sarstedt-Group, Burkhardtsdorf, DE
FACSDiva Version 6.1.2	BD Biosciences, Heidelberg, DE
FlowJo Version 10.7	LLC, Ashland, USA
GraphPad Prism Version 6	Graphpad Software Inc, La Jolla, USA
ImageJ	National Institutes of Health, Bethesda, USA
Microsoft Office	Microsoft Corporation, Redmond, USA
SnapGene 5.2.4	GSL Biotech LLC, San Diego, USA
ZEN 2012 (Blue Edition) Mikroskop-Software	Carl Zeiss AG, Oberkochen, DE

2.2 Methoden

2.2.1 En passant BAC-Mutagenese

Um rekombinante HCMV-BAC-Mutanten mit zu untersuchenden Mutationen zu erzeugen, wurde die Methode der en passant Mutagenese mittels zweistufiger spurloser λ -Red-Rekombination nach dem Protokoll von Tischer et al. (110, 112) angewendet (siehe Abb. 6). Dafür kamen E. coli-Bakterien des Stammes GS1783 zur Verwendung, die das zu modifizierende TB40-BAC4-Genom mit Chloramphenicol-Resistenzgenen beherbergen. Der Bakterienstamm besitzt zudem das hitzeinduzierbare Red-System (exo, beta, gam), welches aus λ -Phagen stammt und die homologe Rekombination von linearer dsDNA ermöglicht. Ferner sind die Bakterien dazu fähig, die I-SceI-Endonuklease zu exprimieren und so eine spurlose zweite Rekombination von eingefügten DNA-Sequenzen zu gewährleisten (110).

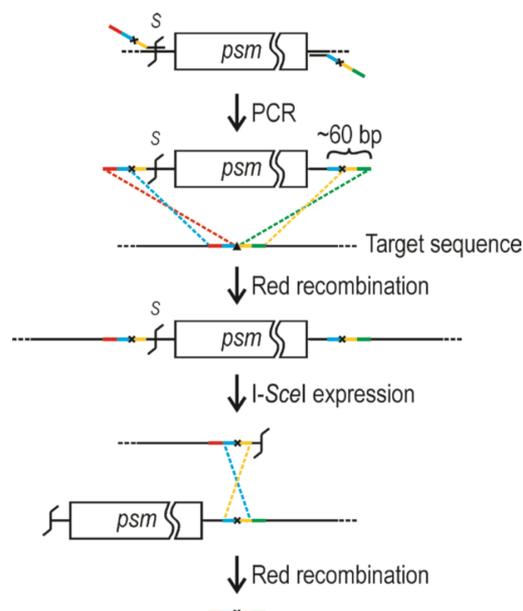


Abb. 6: Prinzip der en passant Mutagenese

1. Rekombination: Per Elektrottransformation wird ein amplifiziertes PCR-Fragment über kurze Homologiesequenzen der BAC-Zielsequenz (rot/blau oder gelb/grün) in das Genom eingefügt. Das PCR-Fragment besitzt eine kurze Sequenzduplikatur (ca. 50-60 bp; blau/gelb) mit integrierter zu untersuchender Mutation (x), einen positiven Selektionsmarker (psm; Kanamycin-Resistenz-Kassette) und eine I-SceI-Schnittstelle (S). Bakterienklone, die rekombinierte BAC-Konstrukte enthalten, können daraufhin mithilfe des psm identifiziert werden. Induziert durch Arabinose, folgt die Expression von I-SceI (GS1783-eigene Endonuklease), die eine Spaltung und Linearisierung der dsDNA über die I-SceI-Schnittstelle (S) hervorruft. Entstehende DNA-Enden der Sequenzduplikatur dienen als Substrat für die 2. Rekombination, wodurch der psm herausgelöst wird und letztlich nur die gewünschte Mutation im BAC verbleibt (102, 110, 112). bp = Basenpaare; I-SceI = Intron-encoded endonuclease I of *Saccharomyces cerevisiae*; psm = positiver Selektionsmarker; S = I-SceI-Schnittstelle. // Quelle: Tischer et al. (110, 112)

2.2.1.1 Konstruktion von PCR-Fragmenten

Die jeweiligen Fragmente mit dem zu untersuchenden DNA-Abschnitt inklusive Mutation und positivem Selektionsmarker (Kanamycin-Resistenz-Kassette) wurden mithilfe des pEPkan-S2-Templates durch eine PCR konstruiert und amplifiziert (siehe Tab 11, 12). Die Primer enthielten an beiden Enden Homologiesequenzen der BAC-Zielsequenz für die erste Rekombination sowie die Sequenzduplikatur mit Mutation für die zweite Rekombination (siehe Tab. 2).

Tab. 11: Reaktionsansatz Mutagenese-PCR

Reagenz	Volumen [μ l]
10X DreamTaq-Polymerase Puffer	10
2,5 mM dNTP-Mix (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)	8
1 ng pEPkan-S2 DNA-Template	1
5 U/ μ l DreamTaq-Polymerase	1
4 nM Primer forward (siehe Tab. 3)	0,5
4 nM Primer reverse (siehe Tab. 3)	0,5
Doppelt-destilliertes Wasser (ddH ₂ O)	ad 100

Tab. 12: Einstellungen Thermocycler Mutagenese-PCR

Phase	Temperatur in °C	Dauer in Sekunden	Zyklen
Initialisierung	94	120	1
Denaturierung	94	30	30
Hybridisierung	50	60	30
Elongation	68	180	30
End-Elongation	72	420	1
Abkühlung	15	∞	1

Agarose-Gelelektrophorese

Um die gewünschten Amplicons auftrennen, identifizieren und anschließend die DNA daraus extrahieren zu können, wurde der PCR eine Agarose-Gelelektrophorese angeschlossen. Zur Auftrennung von Fragmentlängen bis 1000 bp wurde ein Gel mit 1% Agarose in 1X-TBE-Puffer und 0,4 μ g/ml Ethidiumbromid (zur späteren Visualisierung unter UV-Licht) gegossen.

Die PCR-Ansätze wurden mit Ladepuffer (*6X DNA Gel Loading Dye*) versehen und anschließend in die Geltaschen transferiert. Es wurden stets eine Leerkontrolle und ein Marker für die Bestimmung von Fragmentgrößen mitgeführt (*GeneRuler DNA Ladder mix*). Nach einer Laufzeit von 30-40 min bei einer Spannung von 120 mV konnten DNA-Fragment-Banden im Gel durch UV-Licht sichtbar gemacht werden.

DNA-Extraktion aus dem Gel

Im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung wurde das für die Mutagenese benötigte DNA-Fragment per Gelextraktion und Aufreinigung gewonnen. Hierfür wurde das *GeneJet Gel Extraction Kit* verwendet (113). Zunächst wurde ein Stück Gel mit dem gewünschten Fragment mit einem Einmal-Skalpell ausgeschnitten, in ein Reaktionsgefäß überführt und mit einer Analysenwaage gewogen. Im Verhältnis 1:1 zum Gewicht des Gel-Fragments wurde der *Binding Buffer* hinzupipettiert und anschließend bei 55°C und 750 rpm im Thermomixer 10 min lang geschüttelt bis das Gel vollständig gelöst war. Der *Binding Buffer* besteht aus einer chaotropen Lösung, welche die Agarose löst, Proteine denaturiert und die Bindung der DNA an die Silicamembran der Säule im anschließenden Schritt unterstützt. Die entstandene Lösung wurde in einer speziellen Aufreinigungssäule (*GeneJet Purification Column*) 1 min lang bei 15.000 xg zentrifugiert, wodurch DNA an die Silicamembran der Säule binden konnte. Im Anschluss folgte ein Waschschriff durch die Hinzugabe von 700 µl Alkohol-verdünntem *Wash Buffer* und Zentrifugation für 1 min sowie ein weiterer einminütiger Zentrifugationsschritt ohne Puffer, um Alkoholrückstände sicher zu entfernen. Die an die Säulenmembran gebundene DNA wurde schließlich durch 30 µl ddH₂O und zweimalige Zentrifugation für jeweils 1 min in ein 1,5 µl Reagenzgefäß eluiert und anschließend bei -20°C gelagert.

2.2.1.2 Elektrotransformation und erste Red-Rekombination in GS1783-Bakterien

Mithilfe der Elektroporation (vorübergehenden Permeabilisierung der prokaryotischen Zellmembran durch einen kurzen Entladungsstrom (114)) wurde das PCR-Fragment in die GS1783-Bakterien, welche den HCMV-TB40-BAC4-Klon beherbergen, transformiert.

Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Bevor die Einschleusung des gewünschten PCR-Fragments über Elektroporation in *E. coli* stattfinden konnte, mussten die Bakterien elektrokompetent gemacht werden. Hierfür wurden GS178-Bakterien zunächst aus der bei -80°C gefrorenen Stocklösung mit einer sterilen Pipettenspitze entnommen und über Nacht in 3 ml LB/Camp-Medium im

Reagenzglas bei 30°C im Thermoschüttler bei 200 rpm inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 5 ml warmes LB/Camp-Medium in einem Erlenmeyerkolben mit der gewachsenen Bakterienkultur im Verhältnis 1:50 beimpft und bei 32°C und 220 rpm ca. 3 h bis zum Erreichen einer optischen Dichte von 0,5-0,7 bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) geschüttelt. Die Bakterienkultur wurde dann aus dem Erlenmeyerkolben in ein Zentrifugenröhrchen überführt und im Wasserbad bei 42°C und 200 rpm 15 min geschüttelt. Anschließend folgte der für die Elektrokompentenzherstellung notwendige Abkühlungsprozess im Eisbad bei 4°C für 20 min. Danach wurde die Kultur bei 4°C mit 3.800 xg zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 1 ml eiskaltem 10%-igem Glycerol resuspendiert und in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Es folgten zwei weitere Zentrifugations- und Waschschrirte mit 10%-igem Glycerol bei 12.000 xg. Das fertig aufgereinigte elektrokompentente Bakterienpellet wurde in 50 µl 10%-igem eiskaltem Glycerol gelöst und bis zur Elektroporation auf Eis gestellt.

Elektrotransformation des PCR-Fragments in E.coli

Die Transformation des PCR-Fragments in E.coli wurde in folgenden Schritten realisiert: Zunächst wurden 100 ng DNA in das Reaktionsgefäß mit 50 µl elektrokompentente Bakterienkultur pipettiert. Anschließend wurde die entstandene Bakterien-DNA-Suspension in eine gekühlte 1mm-Elektroporationsküvette überführt und sofort mit dem Elektroporationsgerät bei 1,5 kV, 25 µF und 200 Ω gepulst. Unmittelbar danach wurde die Bakteriensuspension mit 1 ml LB-Medium gemischt, aus der Küvette entnommen und in einem Reagenzglas bei 32°C und 200 rpm im Thermoschüttler für 1,5 h inkubiert, um das λ-Red-Rekombinationssystem für eine erste Rekombination zu induzieren.

2.2.1.3 Identifikation rekombinanter Klone (positive Selektion)

Für die Identifikation von Bakterien mit kointegriertem DNA-Fragment im BAC wurde die Bakterienkultur in einem 1,5 ml Reagenzgefäß 1 min lang bei 13.000 xg zentrifugiert, das entstandene Pellet in 100 µl resuspendiert und auf einer LB/Camp/Kana-Agarplatte mit einer Glaspipettenspitze vorsichtig ausgestrichen. Die Agarplatten wurden anschließend für 24-48 h in den 30°C warmen Brutschrank zur Inkubation gestellt. Nur solche Bakterien, die das PCR-Fragment durch Rekombination in das BAC-Genom integriert hatten, konnten durch die enthaltene Kanamycin-Resistenz-Kassette positiv selektiert werden und bildeten nach 24-48 h sichtbare Bakterienkolonien auf den LB/Camp/Kana-Agarplatten.

Jene Bakterienkolonien mit BAC-Klonen wurden schließlich mit einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und in einem Reagenzglas mit 3 ml vorgewärmten LB/Camp/Kana-Medium für 24 h bei 30°C und 200 rpm inkubiert.

Minipräparation und PCR-Diagnostik der BAC-DNA

Die aufgenommenen Klone wurden zusätzlich mittels PCR und Agarose-Gelelektrophorese auf die erfolgreiche Integration des positiven Selektionsmarkers an gewünschter Position geprüft. Hierfür musste die BAC-DNA zunächst im kleinen Maßstab isoliert werden (Minipräparation). Nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly (115)) wurden die Bakterien aufgeschlossen. Dafür wurden die gewachsenen Bakterien als erstes für 2 min bei 13.000 xg zentrifugiert. Es folgte die Resuspension des Bakterienpellets in 100 µl Puffer P1 (siehe Tab. 5). Anschließend wurde Puffer P2 zur alkalischen Lyse der Zelle (durch Bestandteil SDS) und Denaturierung der DNA (durch Bestandteil NaOH) hinzugefügt und vorsichtig bis zur sichtbaren Trübung gemischt. Nach 5 min Kühlung auf Eis wurden 100 µl Puffer P3 (Hauptbestandteil: Kaliumacetat) zur Neutralisation ergänzt und die nicht renaturierende chromosomale DNA 15 min lang bei 13.000 xg abzentrifugiert. Der Überstand mit renaturierter Plasmid-DNA wurde in ein 1,5 ml-Reagenzgefäß pipettiert und mit einer Zentrifugation von 10 min bei 13.000 xg aufgereinigt. Erneut wurde der Überstand in ein 1,5 ml-Reagenzgefäß transferiert und schließlich mit eiskaltem 750 µl Ethanol absolut zur Fällung der DNA gemischt. Nach 30 min Lagerung bei -80°C wurde das Ethanol 15 min bei 13.000 xg abzentrifugiert, 200 µl Ethanol 70% zum Waschen des DNA-Pellets hinzugegeben und wieder 10 min zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes und 10-30 min Lufttrocknung wurde die gefällte DNA letztlich mit 30 µl ddH₂O versetzt. Nach photometrischer Quantifizierung der BAC-DNA konnte eine Diagnostik-PCR angeschlossen werden (siehe Tab. 13, 14). Als Kontrolle wurde TB40-BAC4-Wildtyp-DNA mitgeführt.

Tab. 13: Reaktionsansatz Diagnostik-PCR

Reagenz	Volumen [μ l]
10X DreamTaq-Polymerase Puffer	2
2,5 mM dNTP-Mix (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)	1,6
Template-DNA	2
5 U/ μ l DreamTaq-Polymerase	0,2
DMSO	0,2
5 nM Primer forward (siehe Tab. 4)	0,1
5 nM Primer reverse (siehe Tab. 4)	0,1
Doppelt-destilliertes Wasser (ddH ₂ O)	ad 20

Tab. 14: Einstellungen Thermocycler Diagnostik-PCR

Phase	Temperatur in °C	Dauer in Sekunden	Zyklen
Initialisierung	95	480	1
Denaturierung	95	20	33
Hybridisierung	62	30	33
Elongation	72	120	33
End-Elongation	72	120	1
Abkühlung	15	∞	1

2.2.1.4 Zweite Red-Rekombination mit Entfernung des positiven Selektionsmarkers

Als letzten Schritt der spurlosen Mutagenese folgte die Entfernung des positiven Selektionsmarkers durch die zweite Red-Rekombination freier BAC-DNA-Enden der Sequenzduplikatur, welche durch Spaltung der BAC-DNA durch die I-SceI-Endonuklease entstanden sind. Dafür bedurfte es zunächst der Expression dieser GS1783-eigenen I-SceI-Endonuklease, welche durch einen Arabinose-induzierbaren Promoter eingeleitet wird (110). Die selektierten BAC-Klone wurden in jeweils 1 ml LB/camp (30 μ g/ml) für 1-2 h bei 32°C bis zur Beobachtung einer milchig-trüben Flüssigkeit in einem Schüttelinkubator bei 220 rpm inkubiert. Anschließend wurden 1 ml einer vorgelegten LB/camp + 2% Arabinose-Mischung in jedes Reaktionsgefäß hinzugegeben und für 1 h bei 32°C und 220 rpm geschüttelt.

Um die zweite Red-Rekombination zu induzieren, folgte unmittelbar danach die Überführung in einen 42°C warmen Wasserbad-Schüttler bei 220 rpm. Nach 30 min wurden die Kulturen zurück in den 32°C Schüttelinkubator transferiert und konnten dort für 2-3 h bei 220 rpm hochwachsen. Anschließend wurden jeweils 10 µl der Kultur auf LB/Camp/Arab-Agarplatten ausplattiert und für 1-2 Tage bei 32°C im Brutschrank inkubiert. Mehrere Bakterienkolonien wurden mit einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und auf Replika-Platten mit LB/Camp- und LB/Camp/Kana überimpft. Nachfolgend wurden die Agarplatten für 1-2 d bei 32°C inkubiert. Eine erfolgreiche Herauslösung des positiven Selektionsmarkers (Kanamycin-Resistenz-Kassette) zeigte sich durch ausbleibendes Wachstum auf den LB/Camp/Kana-Agarplatten (Kanamycin-Sensitivität). Der Großteil der zugehörigen Bakterienkulturen wurde direkt genutzt, um BAC DNA zu isolieren, ein anderer Teil wurde zum Frostschutz mit Glycerol im Verhältnis 1:1 gemischt und als Kryokonserven bei -80°C gelagert.

2.2.2 Isolierung und Sequenzierung der BAC DNA

Zur Isolierung der rekombinierten BAC-DNA aus *E. coli* wurde das *NucleoBond Xtra Plasmid Purification Kit* verwendet. Wie auch die Minipräparation basiert die Methode auf der alkalischen Lyse der Bakterien mit Natriumlaurylsulfat (SDS)- und Natriumhydroxid (NaOH)-haltigen Pufferlösungen und der anschließenden Fällung der Plasmid-DNA (115). Einzelne Schritte wurden gemäß dem beiliegenden Protokoll durchgeführt (116). Fertig isolierte BAC-DNA wurde in 100 µl ddH₂O bei 4°C vorübergehend gelagert.

Ein abschließender Nachweis der spurlosen zweiten Rekombination und damit letztlich erfolgreichen Generierung von rekombinanten HCMV-BAC-Klonen mit zu untersuchenden Punktmutationen erfolgte per Sanger-Sequenzierung der betreffenden UL97- und UL54-Genabschnitte über die Firma LGC Genomics GmbH (Berlin, Deutschland). Dafür wurde zunächst eine PCR mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese zum Auftrennen des PCR-Produkts durchgeführt (siehe Tab. 15, 16). Anschließend wurde die BAC-DNA aus dem PCR-Fragment mit dem GeneJet PCR Purification Kit gemäß Protokoll (117) aufbereitet, die DNA-Konzentration photometrisch gemessen und ein 14 µl-Sequenzierungsansatz versendet (siehe Tab. 17).

Tab. 15: Reaktionsansatz PCR für anschließende Sequenzierung

Reagenz	Menge in μl
10X Dream-Taq-Polymerase Puffer	10
2,5 mM dNTP-Mix (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)	8 μl
Template-DNA	1-2
5 U/ μl DreamTaq-Polymerase	1
5 nM Primer forward (siehe Tab. 4)	0,5
5 nM Primer reverse (siehe Tab. 4)	0,5
Doppelt-destilliertes Wasser (ddH ₂ O)	ad 100

Tab. 16: Einstellungen Thermocycler PCR für anschließende Sequenzierung

Phase	Temperatur in $^{\circ}\text{C}$	Dauer in Sekunden	Zyklen
Initialisierung	96	480	1
Denaturierung	96	10	25
Hybridisierung	55	30	25
Elongation	72	120	25
End-Elongation	72	120	25
Abkühlung	15	∞	1

Tab. 17: Sequenzierungsansatz

Reagenz	Volumen [μl]
Template-DNA	*
5 nM Primer (siehe Tab. 4)	4
Doppelt-destilliertes Wasser (ddH ₂ O)	ad 14

* abhängig von der Größe der PCR-Produkte: 500-1000 bp -> 20ng/ μl ; 1000-2000 bp-> 40ng/ μl

2.2.3 Virusrekonstitution in Zellkultur

Für alle nachfolgend beschriebenen Methoden in der Zellkultur wurden primäre humane embryonale Lungenfibroblasten (HEL, Zelllinie Fi301, Passagen 9-18) verwendet. Die Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit auf Kunststoffschalen verschiedener Größe gehalten, täglich unter dem Mikroskop gesichtet und nach Erreichen von ca. 75% Konfluenz im Verhältnis 1:3 passagiert.

Dafür wurde das Medium (EMEM 10%) in der Zellkulturschale abgesaugt, der als adhärent wachsende Zellmonolayer mit PBS gewaschen, über 0,5 ml Trypsin-EDTA gelöst und schließlich in neue Schalen mit frischem Medium transferiert.

Jegliche Arbeiten an offenen Zellkulturschalen wurden sorgfältig unter der sterilen Werkbank und S2-Hygiene- und Sicherheitsstandards verrichtet.

Ansetzen der Zellkultur

Eingefrorene Zellen aus dem Stickstofftank wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in 30 ml Medium mit 210 xg 5 min lang zentrifugiert. Anschließend wurde überstehendes Medium abgesaugt, das Zellpellet resuspendiert und in 25 ml frischem Medium auf einer 15 cm-Zellkulturschale ausplattiert und inkubiert.

2.2.3.1 Transfektion der BAC-DNA in HEL-Zellen

Für die Rekonstitution von infektiösem Virus in der Zellkultur erfolgte zunächst die Transfektion von BAC-DNA in humane Zellen mit dem *Basic Nucleofector™ Kit Amaxa®* von der Firma Lonza nach dem beiliegenden Protokoll (118): Als erstes wurden 6-Well Schalen mit 2 ml Medium im Brutschrank voräquiliert. Danach wurden je Ansatz 2,6 µg BAC-DNA mit 0,7 µg pc-DNA-pp71 (unterstützt u.a. Start der IE-Genexpression) in einem Reaktionsgefäß vorgelegt. Anschließend wurde die gewünschte Zellzahl von 1×10^6 Zellen pro Ansatz mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt und für 10 min bei 89 xg zentrifugiert. Das Medium im Überstand wurde abgesaugt und die Zellpellets in jeweils 100 µl Nucleofektor-Lösung (*Nucleofector™ Solution for Primary Mammalian Fibroblasts + Supplement*) resuspendiert und in das vorgelegte Reaktionsgefäß transferiert. Danach folgte die luftblasenfreie Überführung der Zell-DNA-Suspension mit der Pasteurpipette in die Küvette. Mit dem Puls-Programm A-023 des Nucleofektionsgeräts wurden die in der Suspension enthaltenen Zellen schließlich transfiziert. Unmittelbar danach wurde 500 µl warmes Medium hinzugegeben und die Suspension in die voräquilierte 6-Well-Schale pipettiert. Die Inkubation im Brutschrank erfolgte mit täglichem Mediumwechsel und Passagierung der Zellen bei Erreichen von ca. 75% Zellkonfluenz. Ab dem Zeitpunkt der vollständigen Infektion aller Zellen des Zellmonolayers wurde das Medium von EMEM 10% auf DMEM 2% gewechselt.

2.2.3.2 Virusernte

Zellfreies Virus wurde nach ca. 14-20 d aus dem Überstand von durchinfizierten Zellkulturschalen gewonnen (zytopathischer Effekt (CPE) im gesamten Zellmonolayer und bereits Ablösung einiger Zellen). Dafür wurde das gesamte Medium aus der Zellkulturschale (25 ml) mit der Pipette in ein Reaktionsgefäß aufgenommen und für 6-7 min bei 1314 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde zügig in ein 100 ml-Behältnis (Erlenmeyerkolben) überführt und anschließend zur Lagerung von zellfreiem Virus bei -80°C aliquotiert (je 1,5 ml).

2.2.4 Durchflusszytometrische Immunotitration

Die Quantifizierung von infektiösem HCMV wurde mit der Methode einer Durchflusszytometrie-basierten Immunotitration durchgeführt, welche bereits für andere Viren, wie z.B. Influenza-, Adeno- und Poxviren angewendet wird (119-121). Dies liegt vor allem in der besseren Objektivierbarkeit, Reproduzierbarkeit und Schnelligkeit im Vergleich zu etablierten Methoden wie der TCID₅₀-Bestimmung (Endpunktverdünnungstest) oder dem Plaque Assay begründet (121, 122).

Mittels Durchflusszytometrie können bestimmte Strukturen und Eigenschaften von Zellen sowie Unterschiede einer Zellpopulation analysiert und sichtbar gemacht werden. Das Messprinzip basiert auf der Streuung und Emission von eingestrahltm Licht einer bestimmten Wellenlänge (Laser), welches auf einzeln am Laserstrahl vorbeigeführte Zellen trifft. Je nach Zellstruktur und Fluoreszenzmarkierung wird Licht unterschiedlicher Wellenlänge gestreut oder emittiert und anschließend detektiert. Über eine verbundene Computer-Software wird jede einzelne Zellmessung als Punkt in einem Streudiagramm dargestellt. Benutzerdefiniert können Zellen dann beispielsweise nach Zellgröße oder Antikörper-Färbung differenziert und analysiert werden (123).

In dieser Arbeit wurden infizierte Zellen mit einem Fluorophor-gekoppelten monoklonalen IgG2a-Antikörper (MAB810x Alexa Fluor® 488) markiert, der sich gegen ein nicht-strukturelles IE1/IE2-Antigen richtet, welches ab 1 h nach Infektion bis zum Ende eines HCMV-Infektionszyklus exprimiert wird. Anschließend konnten mittels durchflusszytometrischer Analyse infizierte Zellen (Antikörper-markierte Zellen) von nicht-infizierten Zellen unterschieden und quantifiziert werden. Die Messungen wurden für jeden Virusstamm in biologischen Triplikaten durchgeführt.

2.2.4.1 Infektion und Antikörperfärbung

Für die Infektion mit anschließender Antikörperfärbung und für die spätere Berechnung der Virustiter mussten zunächst Zellen in 6-Well-Schalen gezählt und mit aufgetautem rekombinantem Virus infiziert werden. Hierfür wurden geeignete Verdünnungsstufen (1:1/1:5/1:20/1:100/1:500) gewählt. Auf abgesaugte 6-Well-Schalen wurden 500 µl verdünntes Virus je Well pipettiert und für 1 h im Brutschrank inkubiert, bevor 500 µl wieder abgesaugt und durch 2 ml frisches Medium ersetzt wurden. Nach ca. 20-24 h Inkubationszeit wurden die infizierten Zellen für die Durchflusszytometrie Antikörpermarkiert. Dafür wurden die Zellen durch Ablösung mit 500 µl Trypsin geerntet und in 15 ml-Probenröhrchen mit 2 ml Medium für 5 min bei 210 xg zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 1 ml PBS gelöst und auf Eis mit jeweils 3,5 ml Ethanol absolut bei gleichzeitigem Vortexen versetzt und für mindestens 1 h lang fixiert. Anschließend wurde jede Probe kurz mit dem Vortex-Gerät aufgemischt und für 5 min bei 210 xg zentrifugiert. Es folgte gründliches Absaugen des Überstands, bevor die fixierten Zellen im Pellet in 2 ml 1%-BSA-PBS-Mischung langsam schaumfrei resuspendiert wurden. BSA wurde eingesetzt, um unspezifische Antikörperbindungen zu blockieren. Ein zweiter Zentrifugationsschritt für 5 min bei 210 xg mit folgendem Absaugen schloss die Vorbereitung ab. Schließlich wurde der IE1/IE2 Antikörper in einer 1:2000 Verdünnung in 1%-BSA-PBS auf die fixierten Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von ca. 12 h in einem dunklen und kühlen Raum, wurde jede Probe gewaschen, mit 2 ml 1%-BSA-PBS behandelt und 5 min bei 210 xg zentrifugiert sowie anschließend gründlich abgesaugt. Das Pellet mit Antikörpermarkierten Zellen wurde danach in 400 µl PBS resuspendiert und bis zur Durchflusszytometrie kühl unter Lichtabschluss gelagert.

Unmittelbar vor der durchflusszytometrischen Analyse einer Zellsuspension wurde diese resuspendiert und in ein Analyseröhrchen überführt. Aus diesem konnte das Gerät mit einer Kapillare die Zellsuspension ansaugen und prozessieren. Die prozentuale Anzahl an IE-positiven (infizierten) Zellen in der Suspension wurde über die verbundene Computer-Software angegeben und diente der Berechnung des Virustiters.

2.2.4.2 Berechnung Virustiter

Mithilfe der folgenden Formel wurden anschließend die Virustiter in Infektösen Einheiten pro ml (IU/ml) berechnet:

$$\text{Virustiter in IU/ml} = \frac{\text{Zellzahl/ml} \times (\% \text{ infiz. Zellen} - \% \text{ Leerkontrolle}) \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Virusvolumen(ml)}}$$

* % Leerkontrolle = Hintergrundsignale nicht-infizierter Zellen

2.2.5 In vitro-Wachstumsanalyse durch Erstellen von Wachstumskurven

Da bekannt ist, dass Mutationen die replikative Fitness einer Viruspopulation beeinträchtigen können (124-126), wurden alle neu generierten Virusstämme sowie der Wildtyp als Referenzstamm hinsichtlich der Virusreplikation untersucht. Dafür wurden Zellen mit einer hohen Multiplizität der Infektion (MOI) von 2,5 und einer niedrigen MOI von 0,02 infiziert und über 10 bzw. 20 d in Zellkultur gehalten. Die Virusvolumina, die für die gewünschte MOI nötig waren, wurden mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Volumen (Virus)} = \frac{\text{MOI} \times \text{Volumen (Zellsuspension)} \times \text{Konzentration (Zellsuspension)}}{\text{Konzentration (Virus)}}$$

Anmerkung:

Die Ausgangstitern (Konzentration Virus) der jeweiligen rekombinanten Laborvirusstämme wurden vorher ermittelt. Volumen und Konzentration beziehen sich auf die Zellsuspension, welche mithilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt wurde.

Am ersten Tag nach Infektion wurde in regelmäßigen Abständen freies Virus aus dem Überstand geerntet und bis zur Titerung bei -80°C eingefroren.

Die mikroskopische Sichtung erfolgte täglich, zellmorphologische Veränderungen wurden jeden 2. (hohe MOI) bis 4. d (niedrige MOI) unter dem Mikroskop fotografiert. Schlussendlich konnten mittels Durchflusszytometrie die jeweiligen Virustiter nach unterschiedlicher Inkubationsdauer von 1. / 2. / 4. / 6. / 8. / 10. days post-infection (dpi) für die hohe MOI und 1. / 4. / 8. / 10. / 12. / 16. / 20. dpi für die niedrige MOI bestimmt und Wachstumskurven mithilfe des Programms GraphPad Prism konstruiert werden.

2.2.6 Titer-Reduktions-Assay per durchflusszytometrischer Immunotitration (TRA)

Für die phänotypische Charakterisierung der HCMV-Mutanten bezüglich der Virostatika-Suszeptibilität wurde ein Titer-Reduktions-Assay basierend auf einer durchflusszytometrischen Immunotitration zum ersten Mal etabliert (siehe Abb. 7). Zunächst erfolgte die Infektion der Zellen auf 6-Wellen mit einer MOI von 2,5 in 500 µl je Well. Nach 1 h Inkubation folgte ein Wechsel mit frischem Medium, welchem vorher das Virostatikum in verschiedenen Konzentrationen (+ Kontrolle ohne Virostatikum) für jede zu untersuchende Virusmutante und den Wildtyp hinzugefügt wurde (siehe Tab. 18). Vorerst mussten einige Testversuche mit unterschiedlichen Konzentrationen für die jeweiligen Virostatika GCV und FOS durchgeführt werden, um den EC₅₀-Bereich ausreichend abzudecken. Letztlich wurden folgende Konzentrationsbereiche für die Resistenz-Assays festgelegt:

Tab. 18: Virostatika-Konzentrationen für den Titer-Reduktions-Assay

GCV [µM]	0	0,25	0,5	1	2	4	8
FOS [µM]	0	20	30	40	50	60	

Jeden zweiten Tag wurde die Hälfte des Mediums (1 ml pro Well) abgesaugt und durch frisches Medium inklusive Virostatikum ersetzt. Nach 6 d, zum Zeitpunkt der maximalen Virusvermehrung (bestimmt durch Wachstumskurven), wurde zellfreies Virus aus dem Überstand geerntet. Anschließend wurden Zellen für die durchflusszytometrische Immunotitration in verschiedenen Verdünnungen (1:1 / 1:5 / 1:20 / 1:100 / 1:500) infiziert, geerntet und fixiert sowie Antikörper-markiert (siehe Abschnitt 2.2.4.1). Der Virustiter wurde nachfolgend in Abhängigkeit der relativen Anzahl an IE-positiven Zellen (infizierte Zellen) in der Gesamtzellpopulation berechnet (siehe Abschnitt 2.2.4.2). Der Assay selbst und die Titerung wurden für den HCMV-Wildtyp, für jede HCMV-Mutante und die jeweiligen Virostatika-Konzentrationen in biologischen Triplikaten durchgeführt.

2.2.6.1 Bestimmung der EC₅₀

Für den Titer-Reduktions-Assay per durchflusszytometrischer Immunotitration (TRA) wurde die EC₅₀ definiert als Virostatika-Konzentration, welche die Anzahl IE-positiver Zellen und damit den Virustiter einer infizierten Zellpopulation halbmaximal (um 50%) reduziert.

Mithilfe des Programms GraphPad Prism wurden nicht-lineare Regressionsanalysen unter Konstruktion von Dosis-Wirkungs-Kurven (*drug-response*) durchgeführt und die EC_{50} als Mittelwert der Triplikate über das Analysetool „*Inhibitor vs. Response - Variable Slope (4 parameters)*“ ermittelt (127). Das Verhältnis zum sensitiven Referenzstamm wurde als EC_{50} -Ratio (EC_{50} Mutante \div EC_{50} Wildtyp) berechnet. An der Literatur orientierend wurde eine Virostatika-Resistenz ab einem EC_{50} -Ratio-Grenzwert ≥ 2 angenommen (68).

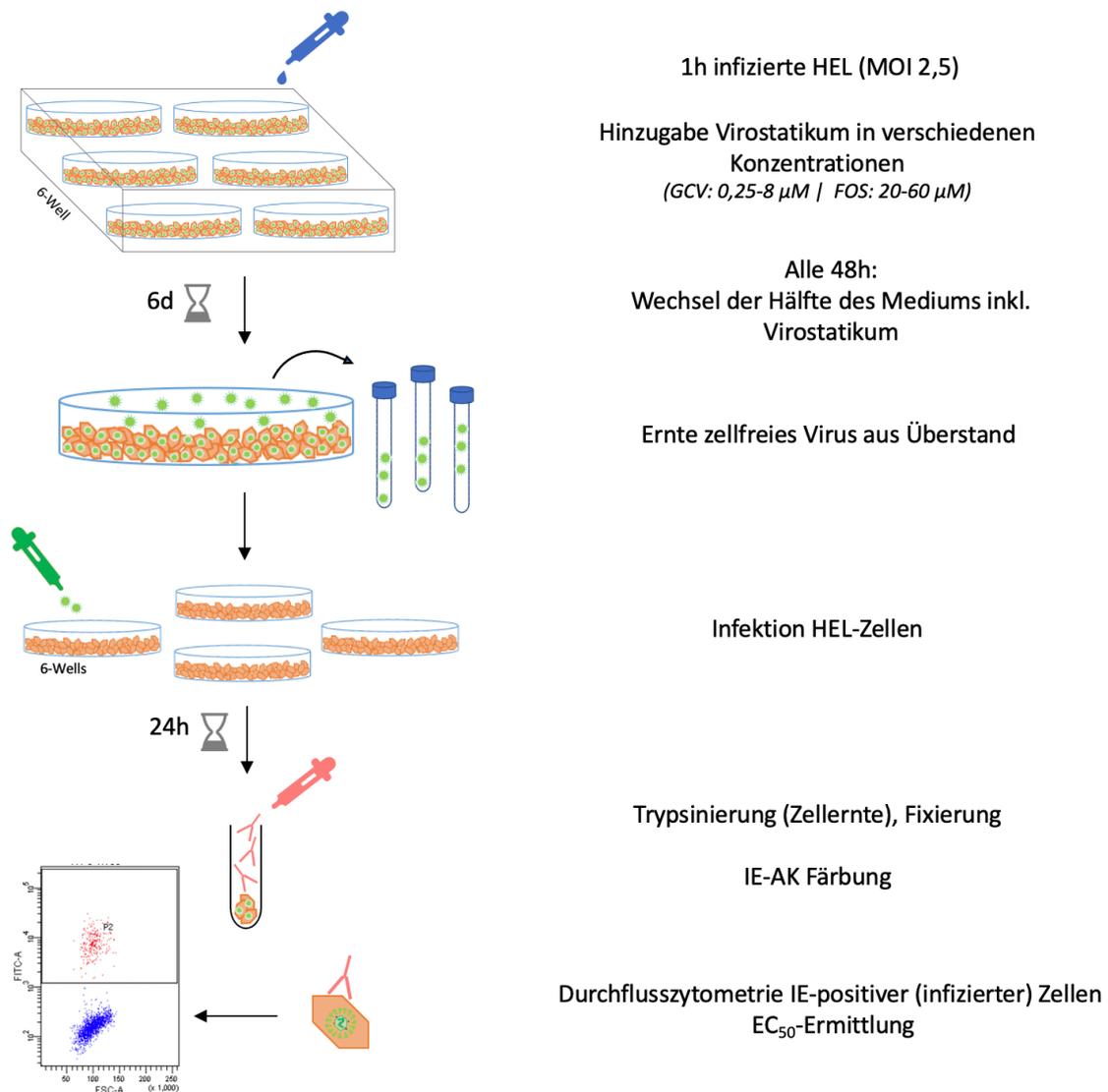


Abb. 7: Schema des Titer-Reduktions-Assays per durchflusszytometrischer Immunotitration (TRA)
HEL = Primäre Humane Embryonale Lungenfibroblasten; MOI = Multiplicity Of Infection; IE-AK = *immediate early*-Antikörper // Quelle: *Eigene Darstellung*

3 Ergebnisse

Aufgrund des Verdachts einer Virostatika-resistenten HCMV-Infektion bei einem pädiatrischen Patienten (siehe Abschnitt 1.5) wurde eine genotypische Resistenztestung per Sanger-Sequenzierung des UL97- und UL54-Gens von HCMV aus virushaltigem Patientenplasma durchgeführt. Es zeigten sich zwei nah beieinander lokalisierte Mutationen im UL54-Gen, welche bis dato noch nicht phänotypisch beschrieben worden waren, sowie bereits beschriebene nicht-resistenzvermittelnde Polymorphismen (siehe Tab. 19). Daraufhin wurde ein HCMV-Isolat generiert und durch das Konsiliarlabor in Tübingen hinsichtlich einer Resistenzvermittlung mittels PRA getestet. Hier zeigte sich eine hochgradige Resistenz gegenüber GCV und eine mäßige Resistenz gegenüber FOS mit folgenden EC_{50} -Werten:

EC_{50} GCV: 26 μ M (Resistenzgrenzwert nach (128): > 6 μ M)
 EC_{50} FOS: 475 μ M (Resistenzgrenzwert nach (128): > 400 μ M)

Um den Einfluss der detektierten unbeschriebenen Mutationen UL54-N855I und UL54-F861Y auf den getesteten Resistenz-Phänotypen des HCMV-Isolats aufzuschlüsseln und die Mutationen im Sinne einer Genotyp-Phänotyp-Korrelation beschreiben zu können, wurde nach dem Prinzip der rekombinanten Phänotypisierung vorgegangen (siehe Abb. 8). Mit dem Ziel, das klinische Isolat des Patienten möglichst realitätsgetreu darzustellen, wurde für die BAC-Mutagenese das aus dem HCMV-Laborstamm TB40-E abgeleitete TB40-BAC4 verwendet (129). Das HCMV-Genom ist im TB40-BAC4 fast vollständig repräsentiert und es sind alle UL54-Sequenzpolymorphismen des klinischen Isolats (S655L, N685S, A885T, N898D) abgebildet (111). Andere BACs von häufig verwendeten HCMV-Laborstämmen, wie Merlin, Toledo, Towne und AD169, enthalten in ihrem Genom keinen oder nur einige der Sequenzpolymorphismen des klinischen Isolats und wären daher für diese Arbeit weniger geeignet gewesen. Des Weiteren wurde TB40-BAC4 bereits in vorherigen publizierten Studien für die rekombinante Phänotypisierung unbeschriebener HCMV-Mutationen verwendet (97, 130-132) und weist nach Transfektion in humane Zellen eine schnelle und hochtitrige Virusreplikation in der Zellkultur auf (129). Das TB40-BAC4 lag bereits in *E. coli*-Bakterien (GS1783) vor, sodass das Einfügen der Punktmutationen mittels *in situ* Mutagenese (siehe Abschnitt 2.2.1) und damit Generierung von HCMV-Mutanten problemlos möglich war.

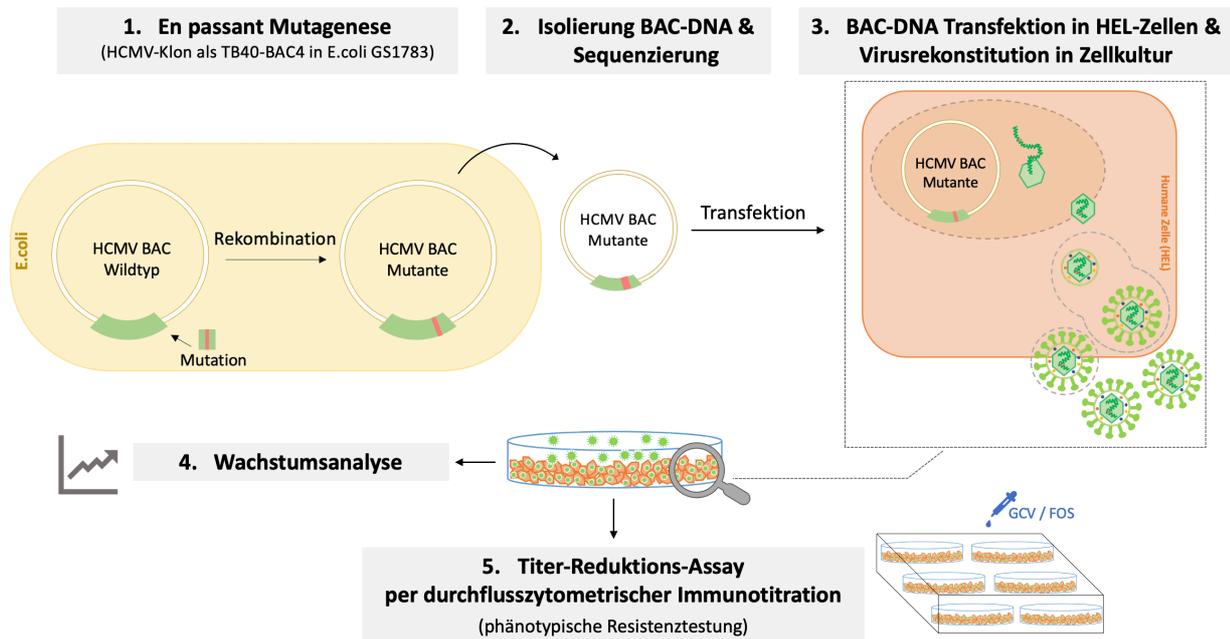


Abb. 8: Schema der rekombinanten Phänotypisierung

(1.) Zunächst mussten HCMV-Mutanten über die BAC-Technologie rekombiniert werden. Hierfür wurden DNA-Fragmente mit den zu untersuchenden Mutationen in einer PCR generiert und anschließend mittels en passant Mutagenese über ein BAC in E. coli kloniert. (2.) Aus E. coli wurde dann die als BAC vorliegende klonierte HCMV-DNA isoliert und (3.) in humane Zellen transfiziert. So konnte infektiöses Virus rekonstituiert, angezchtet und schließlich für (4. / 5.) phänotypische Untersuchungen genutzt werden.
 // Quelle: Eigene Darstellung

Für die Einordnung der Ergebnisse des neu etablierten Titer-Reduktions-Assays per durchflusszytometrischer Immunotitration war es erforderlich, einen sensitiven HCMV-Stamm und HCMV-Mutanten mit bekannten resistenzvermittelnden Mutationen als Referenz mitzuführen (90). Es wurden daher zusätzliche HCMV-Mutanten mit Mutationen generiert (siehe Tab. 19), die als hochgradig resistenzvermittelnd gegenüber GCV und FOS bekannt sind und häufig in klinischen HCMV-Isolaten detektiert werden (62, 68, 133, 134).

Tab. 19: Mutationen des HCMV-Isolats und mitgeführte Referenzmutationen

Mutation(en) ^a	Gen	Resistenz (EC ₅₀ -Ratio) ^b
Wildtyp (TB40-BAC4)	UL97/UL54	keine
M460I	UL97	GCV (5)
A987G	UL54	GCV (5,3); CDV
A809V	UL54	FOS (6,3); GCV (2,6)
N855I/F861Y^c	UL54	zu phänotypisieren
N855I^c	UL54	zu phänotypisieren
F861Y^c	UL54	zu phänotypisieren

*zusätzlich im HCMV-Isolat detektierte bekannte

Polymorphismen: S655L, N685S, A885T, N898D (80)

^a Der Großbuchstabe vor der Ziffer entspricht der Aminosäure in Wildtyp-Form, der Großbuchstabe hinter der Ziffer entspricht der durch Punktmutation ausgetauschten Aminosäure; ^b Referenzliteratur: (68, 133, 135, 136)

^c neu detektierte unbeschriebene Mutationen des HCMV-Isolats

3.1 Konstruktion von HCMV-BAC-Mutanten

3.1.1 Herstellung der PCR-Fragmente

Für alle zu untersuchenden Mutationen konnten PCR-Fragmente generiert werden. Die Amplifikation der PCR-Fragmente, welche die zu untersuchenden Mutationen und die Kanamycin-Resistenzkassette als positiven Selektionsmarker sowie Sequenzduplikaturen für die Mutagenese enthielten (siehe Abschnitt 2.2.1), wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert. Eine erfolgreiche Konstruktion der PCR-Fragmente zeigte sich durch eine Bandenfärbung bei 1 kbp.

3.1.2 Positive Selektion nach erster Red-Rekombination

Das Einfügen des PCR-Fragments inklusive der Kanamycin-Resistenz-Kassette in das TB40-BAC4 der E. coli GS1783 konnte durch sichtbare Bakterienkolonien auf LB/Camp/Kana-Agarplatten nach 24-48 h angenommen werden. Ob die erste Red-Rekombination auch an gewünschter Position im BAC-Genom stattgefunden hatte und die Kanamycin-Resistenz nicht nur das Ergebnis einer ektopen Integration der Kanamycin-Resistenz-Kassette war, wurde durch eine Diagnostik-PCR kontrolliert. Erfolgreich rekombinierte BAC-Klone mit Integration des PCR-Fragments innerhalb der BAC-Zielsequenz konnten anhand der Größenzunahme in der Agarose-Gelelektrophorese identifiziert werden (siehe Abb. 9 und 10).

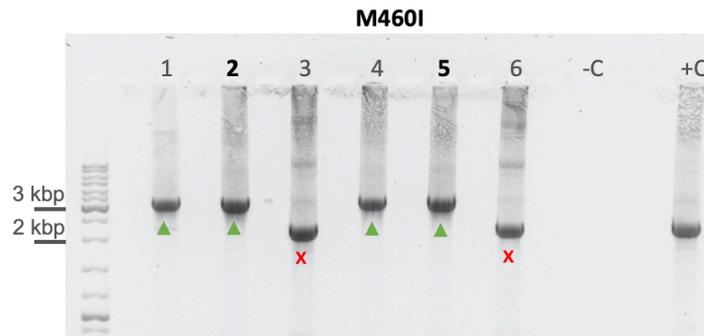


Abb. 9: Erfolgskontrolle des ersten Rekombinationsschrittes in UL97 (Zuschnitt)

Eine homologe Rekombination mit Integration des PCR-Fragments (inklusive UL97-M460I) innerhalb der UL97-BAC-Zielsequenz zeigte sich in der Agarose-Gelelektrophorese durch eine sichtbare Bande bei 3 kbp (grüner Pfeil; PCR-Fragment 1 kbp + UL97-BAC-Amplicon 2 kbp). Klon 2 und 5 (fett markiert) wurden für weitere Mutagenese-Schritte verwendet. -C = negative Kontrolle (Geltasche ohne DNA/PCR-Produkt); +C = positive Kontrolle (DNA des betreffenden TB40-BAC4 Wildtyp-Amplicons mit einer Größe von 2 kbp).

// Quelle: Eigene Fotografie

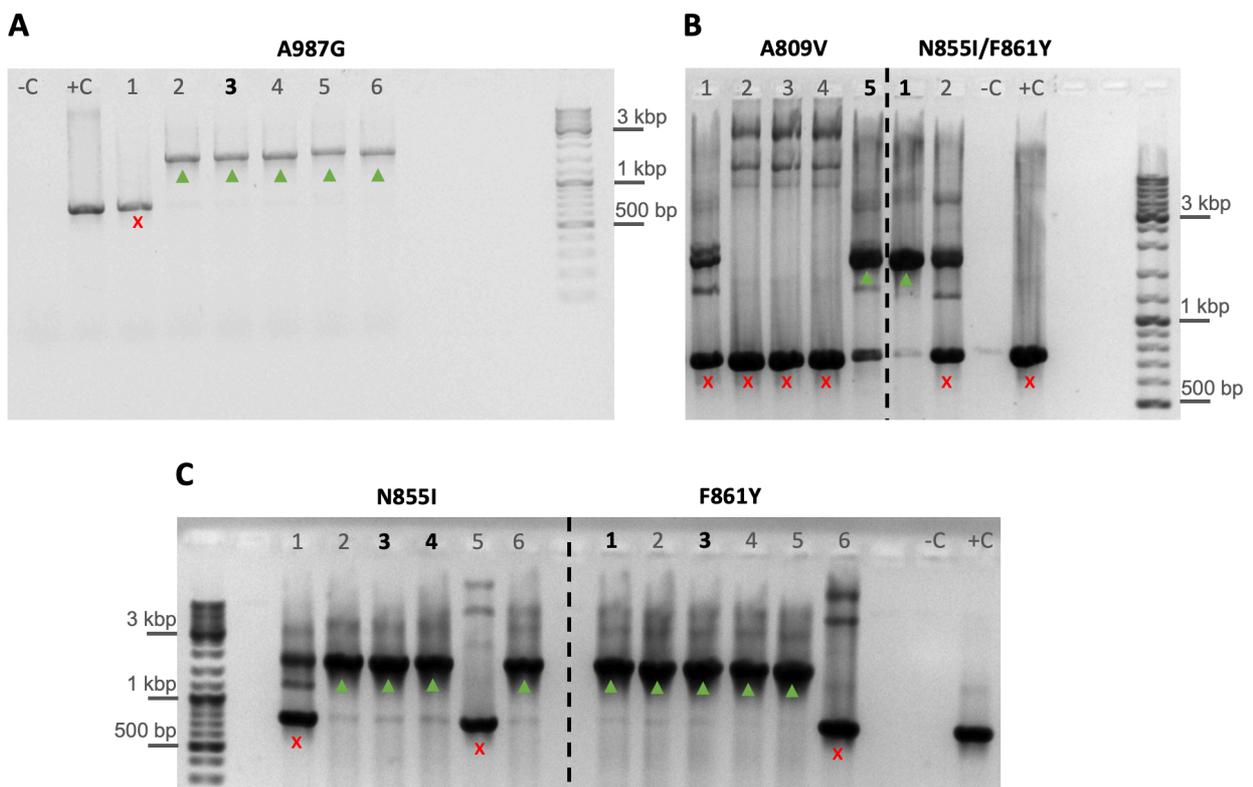


Abb. 10: Erfolgskontrolle des ersten Rekombinationsschrittes in UL54 (Zuschnitte)

(A)-(C) Eine homologe Rekombination mit Integration des PCR-Fragments (inklusive der jeweiligen Mutation) innerhalb der gewünschten UL54-BAC-Zielsequenz zeigte sich in der Agarose-Gelelektrophorese durch eine sichtbare Bande bei 1,7 kbp (grüner Pfeil; PCR-Fragment 1 kbp + UL54-BAC-Amplicon 700 bp). Klone, die für weitere Mutagenese-Schritte verwendet wurden sind fett markiert. -C = negative Kontrolle (Geltasche ohne DNA/PCR-Produkt); +C = positive Kontrolle (DNA des betreffenden TB40-BAC4 Wildtyp-Amplicons mit einer Größe von 700 bp).

// Quelle: Eigene Fotografie

3.1.3 Negative Selektion nach zweiter Red-Rekombination

Durch Arabinoseinduktion der I-SceI-Endonuklease, welche die BAC-DNA an der integrierten I-SceI-Schnittstelle spalten konnte, fand die zweite Red-Rekombination statt, wodurch die Selektionsmarkerkassette (Kanamycin-Resistenz) wieder herausgelöst wurde (siehe Abschnitt 2.2.1.4). Da das TB40-BAC-4 über ein Camp-Resistenzgen verfügt, welches durch die Mutagenese nicht beeinträchtigt wurde, wuchsen alle angeimpften Bakterien mit den beherbergten BAC-Klonen auf der LB/Camp-Agarplatte heran. Ein ausbleibendes Wachstum auf der LB/Camp/Kana-Agarplatte deutete auf die gelungene Entfernung der Selektionsmarkerkassette hin, da damit auch die Kanamycin-Resistenzfähigkeit verloren ging (siehe Abb. 11).

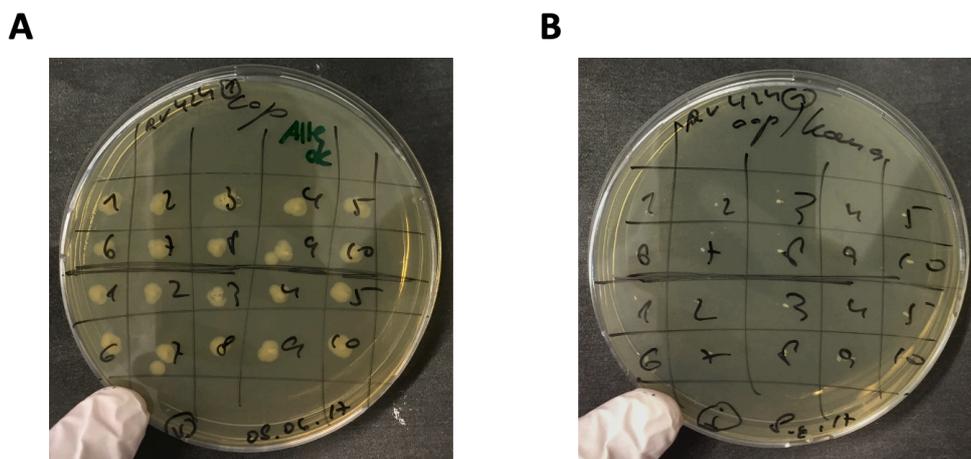
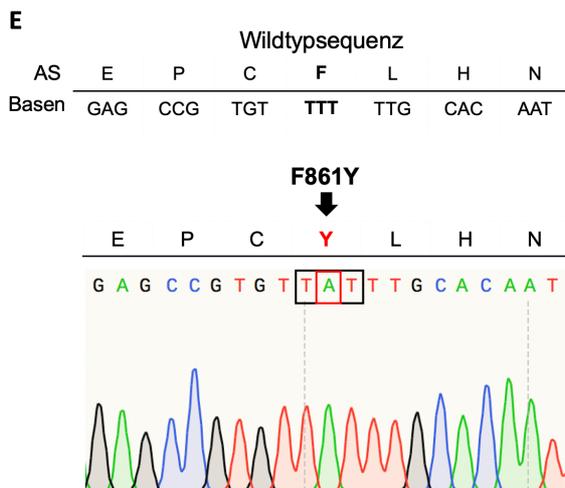
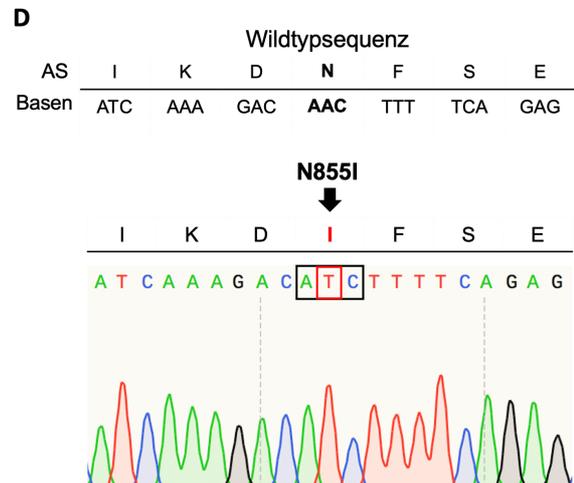
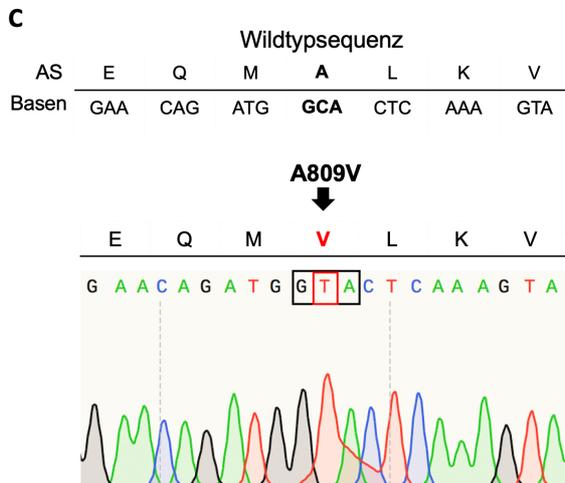
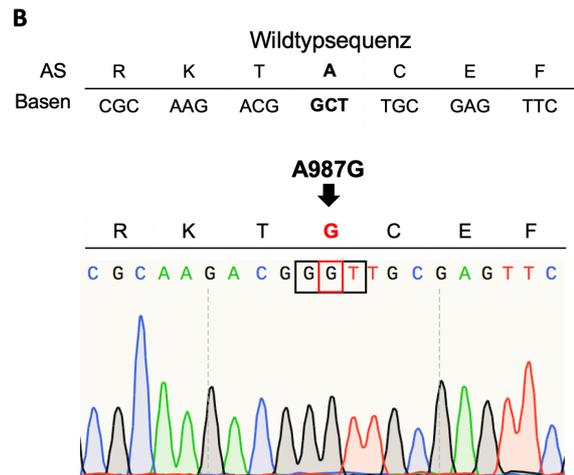
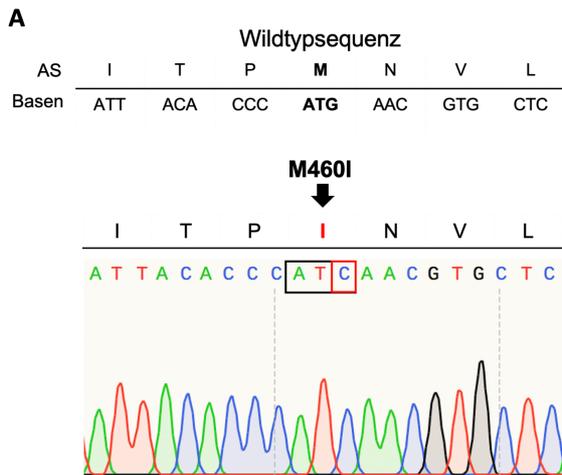


Abb. 11: Negative Selektion rekombinanter BAC-Klone nach zweiter Rekombination (Beispiel)

(A) Camp-Resistenz: Uneingeschränktes Heranwachsen aller Bakterienkolonien mit beherbergten BAC-Klonen auf der Camp-Agarplatte, ermöglicht durch das in TB40-BAC-4 enthaltene Camp-Resistenz-Gen, welches nicht durch die Mutagenese verändert wurde. (B) Kanamycin-Sensitivität: Ausbleibendes Wachstum auf der Camp/Kana-Platte als Zeichen einer erfolgreichen Exzision der Kanamycin-Resistenz-Kassette. // Quelle: Eigene Fotografie

3.1.4 Sequenzierung der rekombinanten BAC-Klone

Vor der Transfektion isolierter BAC-DNA in humane Zellen konnte eine erfolgreiche spurlose Mutagenese ohne unerwünschte Sequenzveränderungen per Sanger-Sequenzierung des betreffenden Gen-Abschnitts nachgewiesen werden. So konnte zusätzlich zur Sensitivitätskontrolle auf Antibiotika-Agarplatten nicht nur die Entfernung der Selektionsmarkerkassette bestätigt werden, sondern auch eine spurlose Mutagenese mit ausschließlich gewünschter Punktmutation ohne zusätzliche Sequenzveränderungen (siehe Abb. 12).



Fortsetzung auf Seite 45

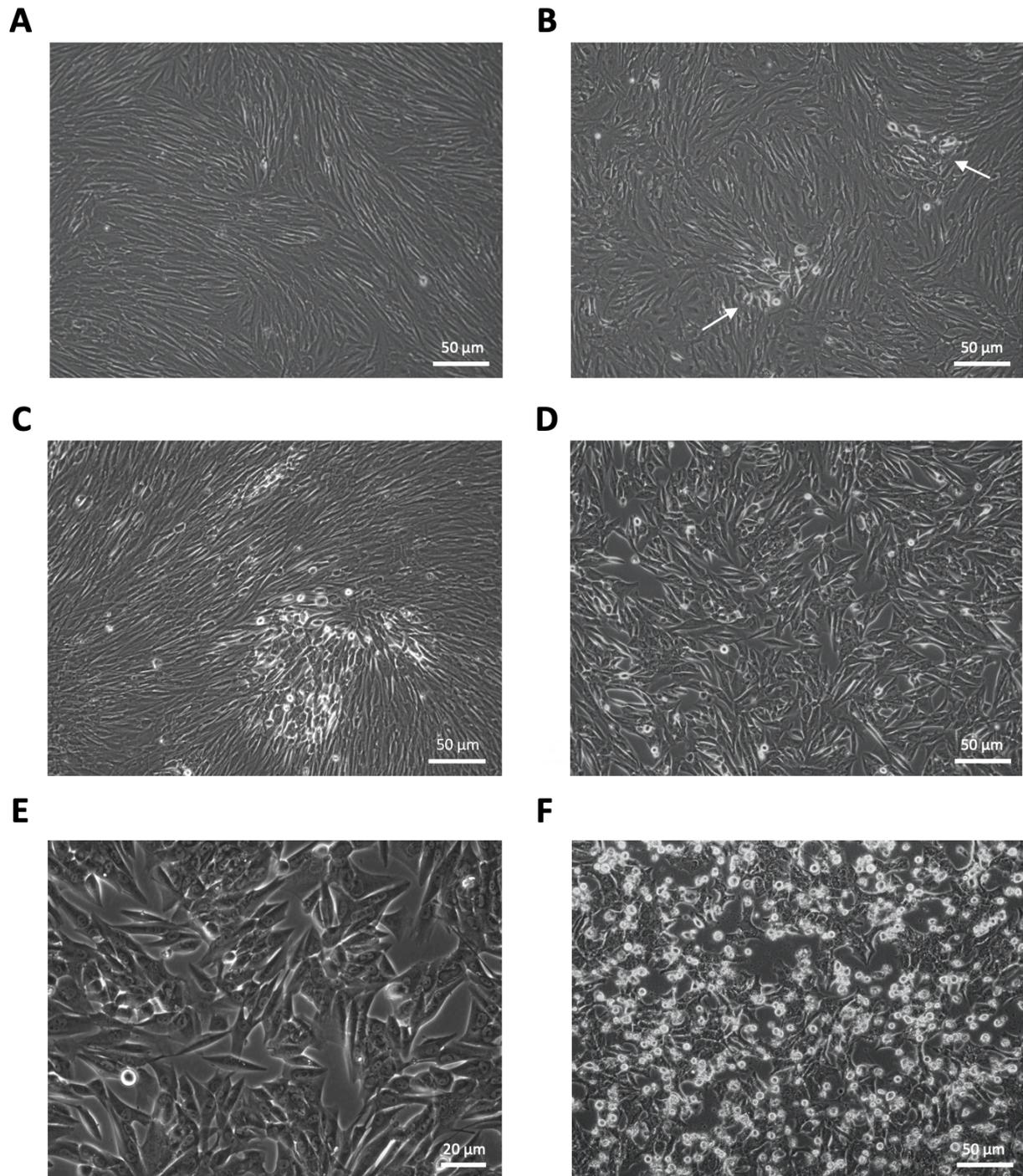


Abb. 13: Virusrekonstitution in HEL-Zellkultur

(A) Konfluentes Wachstum von nicht-infizierten HEL-Zellen (Fi301), 10X-Vergrößerung; (B)-(F) Zeitlicher Ablauf der Virusrekonstitution nach Transfektion; (B): 4-6 d: Bildung vereinzelter Plaques (Pfeile), 10X-Vergrößerung; (C) 7-12 d: Plaqueeausdehnung; 10X-Vergrößerung; (D) 14-16 d: durchinfizierter Zellmonolayer, 10X-Vergrößerung; (E) Charakteristischer zytopathischer Effekt (CPE) in durchinfiziertem Zellmonolayer, 20X-Vergrößerung; (F) 20-23 d: Lysierte Zellen, kurz vor der Virusernte aus dem Überstand, 10X-Vergrößerung // Quelle: Eigene Fotografie über Mikroskop Zeiss Axio Vert.A1 und ZEN-Software

3.2.2 Virusquantifizierung mittels durchflusszytometrischer Immunotitration

Zellfreies Virus konnte mittels durchflusszytometrischer Immunotitration quantifiziert werden (siehe Abb. 14A, 14B). Die Methode beruht auf der Berechnung des viralen Titers über die Anzahl IE-Protein-Antikörper-markierter (infizierter) Zellen in einer Gesamtzellpopulation nach Inokulation mit zellfreiem Virus (siehe Abschnitt 2.2.4). Die relative Anzahl infizierter Zellen wurde 24h nach Infektion mittels Durchflusszytometrie bestimmt, da zu diesem Zeitpunkt des Infektionszyklus genug IE-Proteine gebildet werden, jedoch noch keine neuen Viruspartikel zur Reinfektion und damit Verfälschung der Ergebnisse (Überschätzung des viralen Titers) vorliegen. Anschließend wurde der Titer in Abhängigkeit der analysierten Prozentzahl IE-positiver (infizierter) Zellen errechnet (siehe Abb. 14C). Für alle rekonstituierten HCMV-Mutanten ergaben sich ähnlich hohe Virustiter zwischen $8,4 \times 10^6$ - $4,48 \times 10^7$ IU/ml.

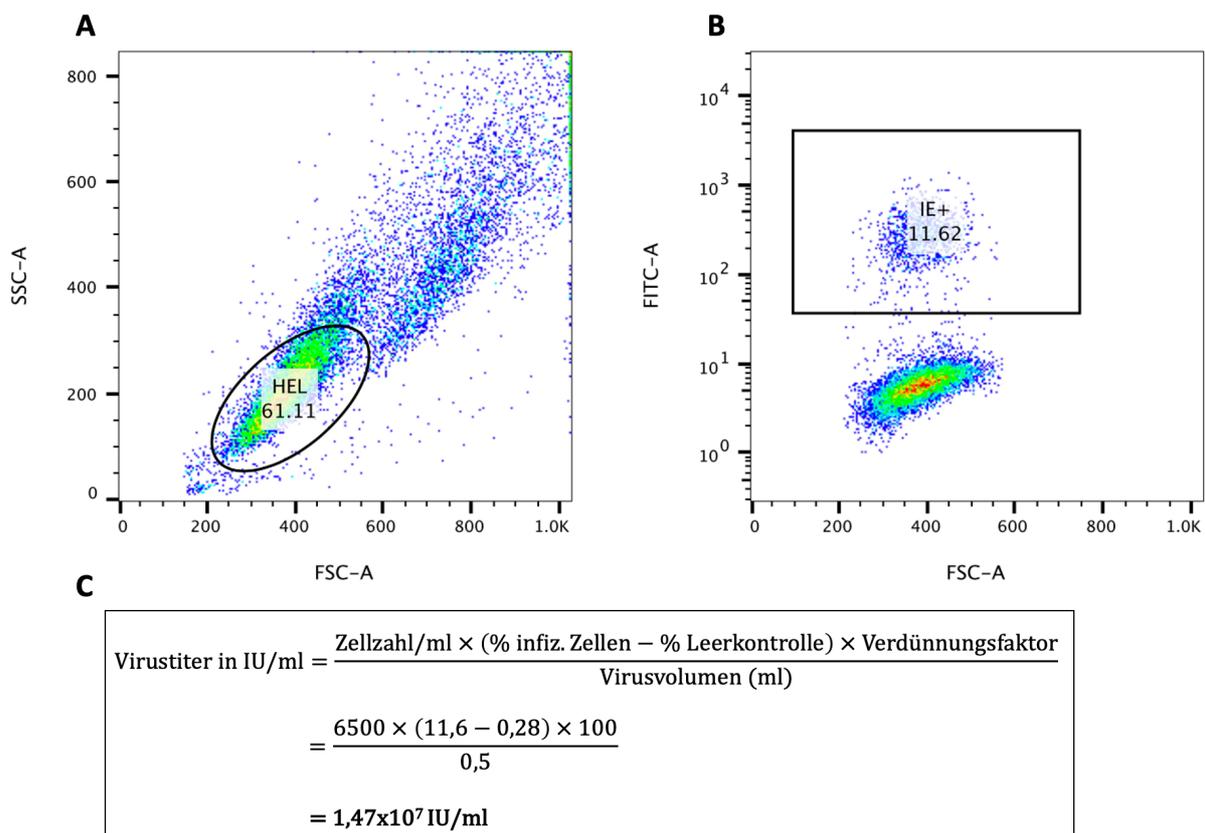


Abb. 14: Beispiel einer durchflusszytometrischen Immunotitration (Wildtyp-infizierte Zellpopulation)

Quantifizierung IE-positiver (infizierter) Zellen mittels Durchflusszytometrie und nachfolgender Virustiter-Berechnung. (A) Detektierte HEL-Gesamtpopulation, FSC-SSC Gating, um Aggregate, Dubletten und Debris auszuschließen. (B) Separation der ausgewählten HEL-Population und Quantifizierung der infizierten Zellen (IE+ in Prozent) mithilfe des FITC-Signals. (C) Virustiter-Berechnung in IU/ml. SSC-A = side-scattered light (Seitwärtsstreulicht); FSC-A = forward-scattered light (Vorwärtsstreulicht); FITC-A = Fluoresceinisothiocyanat; HEL = Primäre Humane Lungenfibroblasten (IE-negativ, nicht-infiziert); IE+ = IE-positive HEL-Zellen (infiziert); IU/ml = Infektiöse Einheiten pro Milliliter (engl. infectious units per ml)
// Quelle: Zuschnitt aus Batch Analysis-Export über FlowJo-Software

3.2.3 In vitro-Wachstumsanalyse der HCMV-Mutanten

Einige resistenzvermittelnde UL54-Mutationen schränken die Virusreplikation ihres HCMV-Stammes durch Verminderung der UL54-Polymerase-Aktivität ein (97, 124, 136, 139-141). Da Resistenz-Assays auf der Vermehrung des HCMV-Stammes in der Zellkultur basieren, können Einschränkungen der Virusreplikation folglich zu Fehlinterpretationen der Virostatika-Suszeptibilität führen (125, 140). Des Weiteren wird von zusätzlichen nicht-resistenzvermittelnden Mutationen innerhalb eines HCMV-Stammes berichtet, welche eine verminderte Virusvermehrung kompensieren können. Diese Mutationen sind bei der Analyse von genotypischen Resistenztestungen im klinischen Kontext ebenso wichtig zu berücksichtigen wie direkt resistenzvermittelnde Mutationen, da sie die virale replikative Fitness und letztlich auch den klinischen Verlauf einer HCMV-Infektion beeinflussen können (67, 125, 140).

Für die Untersuchung der Replikationskinetik generierter HCMV-Mutanten wurden konfluente HEL-Zellen (Fi301) mit einer hohen (2,5) und niedrigen (0,02) MOI infiziert und virushaltiger Überstand alle 2 (hohe MOI) bzw. 4 Tage (niedrige MOI) geerntet. Unter Bedingungen einer niedrigen MOI kommt es statistisch gesehen seltener zu einer Infektion einzelner Zellen mit mehreren infektiösen Partikeln. Demnach lässt sich die Virusvermehrung durch mehrere Replikationszyklen und die Ausbreitungsfähigkeit innerhalb des Zellverbands genauer darstellen.

Morphologische Zellveränderungen, die unter dem Mikroskop sichtbar waren, wurden protokolliert und fotografiert. Zellen, die mit dem HCMV-Wildtyp infiziert worden waren, zeigten als erstes zytopathische Veränderungen, sowohl unter hoher MOI (ab 2. dpi) als auch unter niedriger MOI (ab 6. dpi), jedoch maximal 1-2 Tage vor den mit HCMV-Mutanten infizierten Zellen. Insgesamt konnten visuell keine wesentlichen Unterschiede zwischen den einzelnen HCMV-Mutanten und dem Wildtyp (Referenzstamm) bezüglich Zellmorphologie und Ausbreitungsgeschwindigkeit beobachtet werden. Eine genauere Analyse gelang mit dem Erstellen von Wachstumskurven.

3.2.3.1 Wachstumskurven der HCMV-Mutanten

Die über 10 Tage (high MOI) bzw. 20 Tage (low MOI) lang geernteten virushaltigen Überstände wurden für jeden Tag und jede HCMV-Mutante in biologischen Triplikaten mittels durchflusszytometrischer Immunotitration (siehe 2.2.4) quantifiziert. Zur besseren Vergleichbarkeit zwischen HCMV-Mutanten und HCMV-Wildtyp wurde die Virusvermehrung durch Wachstumskurven visualisiert (siehe Abb. 15).

Hohe MOI

Unter hoher MOI zeigt sich für alle HCMV-Mutanten eine typisch sigmoidale Wachstumskurvenform, welche dem HCMV-Wildtyp (Referenzstamm) sehr ähnlich ist (siehe Abb.15A). Die Virustiter beginnen ab dem 2. dpi steil anzusteigen bis die Zunahme um den 6. dpi abflacht. Die Kurve des Wildtyps zeigt am 6. dpi bereits sein Maximum mit anschließend beginnender Regression, während die HCMV-Mutanten ihren maximalen Virustiter um den 8.-10. dpi erreichen.

Insgesamt lassen sich unter hoher MOI keine wesentlichen Unterschiede der Replikationskinetik zwischen Wildtyp und den HCMV-Mutanten erkennen, die maximalen Virustiter liegen zwischen ca. $5,7 \times 10^6$ (UL97-M460I) und $1,5 \times 10^7$ IU/ml (UL54-F861Y).

Niedrige MOI

Die Wachstumskurven der einzelnen HCMV-Mutanten zeigen unter niedriger MOI eine leicht verzögerte (ca. 4 d) und über den Zeitraum von 20 Tagen eine insgesamt verminderte Virusreplikation im Vergleich zum HCMV-Wildtyp (siehe Abb. 15B).

Der stärkste Virustiteranstieg zeigt sich zwischen dem 8. bis 16. dpi. Während die Vermehrung des HCMV-Wildtyps und der HCMV-Mutante UL54-N855I ab dem 16. dpi rückgängig ist, lässt sich bei den anderen HCMV-Mutanten noch ein leichter (UL97-M460I, UL54-A809V, UL54-N855I/F861Y) bis etwas stärkerer Anstieg (A987G, F861Y) verzeichnen. UL97-M460I zeigt von allen HCMV-Mutanten die geringste Wachstumskapazität mit ca. $6,7 \times 10^4$ IU/ml (> 20-fach geringer als der Wildtyp). UL54-A987G erreicht bis zum 20. dpi mit ca. $8,4 \times 10^5$ IU/ml den höchsten Virustiter nach dem HCMV-Wildtyp mit einem maximalem Virustiter von ca. $1,6 \times 10^6$ IU/ml.

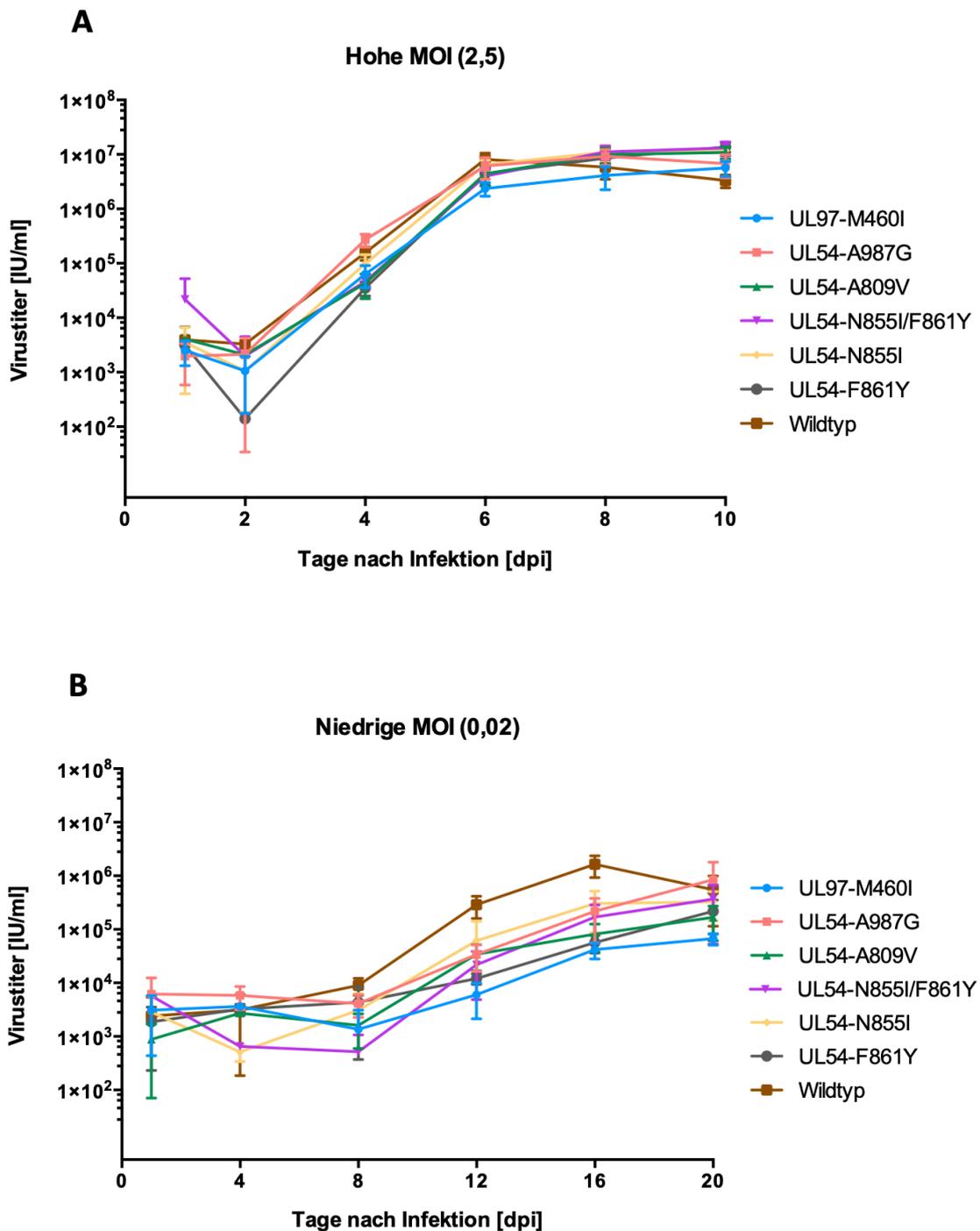


Abb. 15: Replikationskinetik der HCMV-Mutanten unter hoher und niedriger MOI

Primäre humane embryonale Lungenfibroblasten (HEL; Fi301) wurden mit generierten HCMV-Mutanten und dem HCMV-Wildtyp (WT) unter hoher MOI (2,5) und niedriger MOI (0,02) infiziert. Der virushaltige Überstand wurde zu den auf der X-Achse angegebenen Zeitpunkten nach Infektion (dpi) geerntet, die Quantifizierung erfolgte per durchflusszytometrischer Immunotitration. Die Symbole der Wachstumskurven repräsentieren den Mittelwert von biologischen Triplikaten, Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. MOI = Multiplizität der Infektion (engl. multiplicity of infection). *Anmerkung: Vereinzelt Replikate ergaben Minuswerte, die nicht berücksichtigt wurden.*

3.2.4 Virostatika-Suszeptibilität der HCMV-Mutanten

Um die neuen unbeschriebenen Mutationen hinsichtlich der Virostatika-Suszeptibilität phänotypisch zu charakterisieren und damit auch die Frage beantworten zu können, ob diese für die klinische Virostatika-Resistenz des Patienten verantwortlich gewesen sein könnten, wurde für die einzelnen generierten HCMV-Mutanten eine phänotypische Resistenztestung basierend auf der Virostatika-abhängigen Titer-Reduktion (in der englischsprachigen Fachliteratur bekannt als *Yield Reduction*) durchgeführt (siehe Abschnitt 2.2.6). Virale Titer wurden dabei mittels durchflusszytometrischer Immunotitration quantifiziert. Für jede HCMV-Mutante konnten Dosis-Wirkungs-Kurven aus den Werten biologischer Triplikate erstellt werden, die das Ansprechen der HCMV-Mutanten auf die Virostatika GCV und FOS veranschaulichen (siehe Abb. 16, 17). Zusätzlich konnten jeweils die halbmaximale effektive Konzentration (EC_{50}) und das Verhältnis zum Virostatika-sensitiven HCMV-Wildtyp (EC_{50} -Ratio = EC_{50} Mutante \div EC_{50} Wildtyp) als vergleichbares Maß für die Suszeptibilität einer HCMV-Mutante gegenüber GCV und FOS bestimmt werden. Eine Virostatika-Resistenz wurde ab einer EC_{50} -Ratio ≥ 2 angenommen. Der TB40-BAC4-Wildtyp und bekannte resistenzvermittelnde Mutationen (UL97-M460I, UL54-A987G, UL54-A809V; siehe Tab. 19) wurden als Referenz mitgeführt.

3.2.4.1 GCV-Suszeptibilität der HCMV-Mutanten

Für den HCMV-Wildtyp als Virostatika-sensitiven Referenzstamm zeigt sich die Inhibition der viralen Replikation in Abhängigkeit steigender GCV-Konzentration in einer typischen sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Kurve mit einer zunächst geringen Abnahme des Virustiters, der ein steiler Abfall nach einem Wendepunkt folgt (siehe Abb. 16A). Die EC_{50} für GCV konnte mit $0,70 \mu\text{M}$ berechnet werden.

Die Referenzmutante UL97-M460I, welche in der Literatur als GCV-resistent beschrieben wird (68, 133, 135), zeigt eine deutlich verzögerte Abnahme des Virustiters unter steigender GCV-Konzentration (siehe Abb. 16B), was sich auch in einer höheren EC_{50} mit $3,73 \mu\text{M}$ ausdrückt. Die EC_{50} ist in etwa fünfmal so hoch wie die des Wildtyps (EC_{50} -Ratio 5,33), was auf eine hochgradige Resistenz (Grenzwert EC_{50} -Ratio: ≥ 2) hindeutet. Für die Referenzmutante UL54-A987G, welche als resistenzvermittelnd gegenüber GCV beschrieben ist (68, 136), zeigt sich in der Dosis-Wirkungs-Kurve ein etwas weniger steiler Abfall des Virustiters als beim Wildtyp (siehe Abb. 16C).

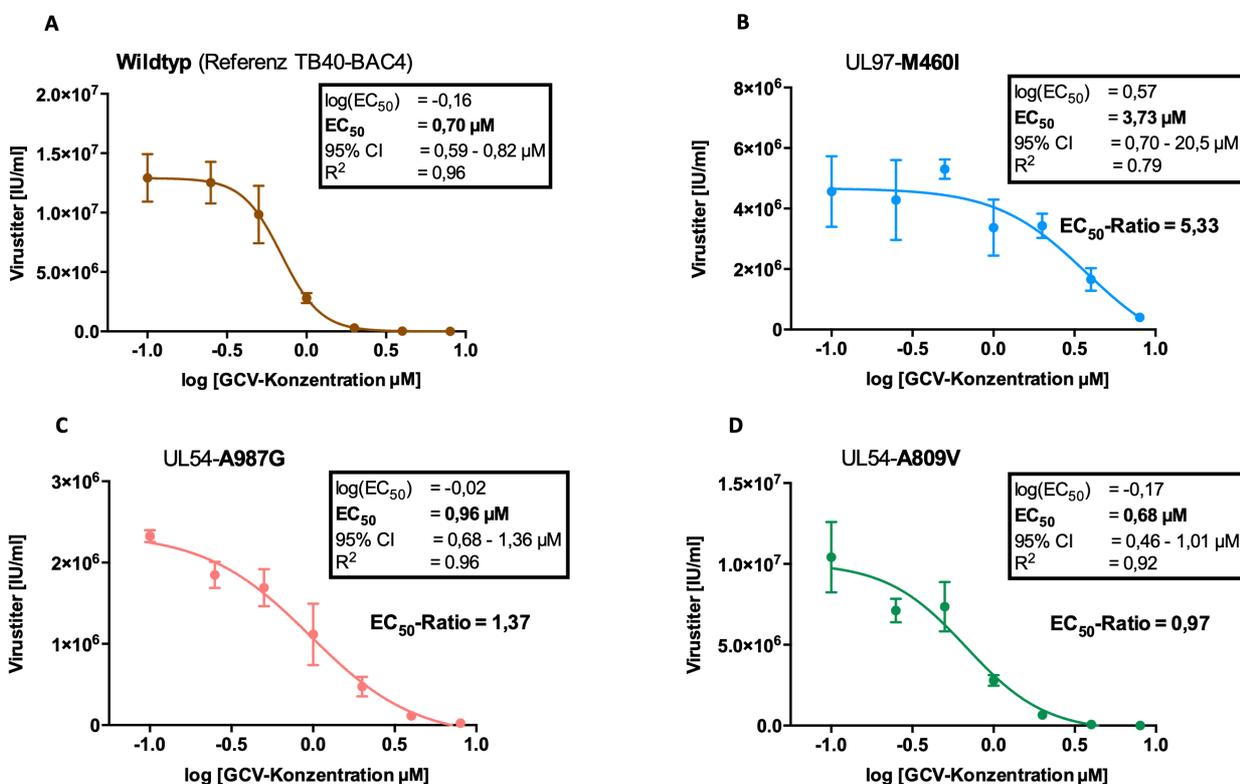
Die EC_{50} für GCV beträgt $0,96 \mu\text{M}$ und die EC_{50} -Ratio $1,37$, was für eine verringerte GCV-Suszeptibilität spricht.

Die Dosis-Wirkungs-Kurve der Referenzmutation UL54-A809V als beschriebene resistenzvermittelnde Mutation gegenüber FOS zeigt einen ähnlichen Verlauf wie die des HCMV-Wildtyps. Für GCV konnte eine EC_{50} von $0,68 \mu\text{M}$ ermittelt werden (siehe Abb. 16D). Die EC_{50} -Ratio liegt bei $0,97$, was auf eine GCV-Sensitivität hindeutet.

Die zu phänotypisierende HCMV-Doppelmutante UL54-N855I/F861Y zeigt in der Dosis-Wirkungs-Kurve einen steilen Abfall des Virustiters unter steigender GCV-Konzentration, was eine höhere Suszeptibilität und damit geringere EC_{50} für GCV vermuten lässt (siehe Abb. 16E). Die Berechnung einer EC_{50} von $0,36 \mu\text{M}$ und einer EC_{50} -Ratio von $0,51$ unterstützen diese Annahme und sprechen für eine GCV-Sensitivität.

Die einzelne zu phänotypisierende Mutation UL54-N855I vermittelt eine fast gleich hohe EC_{50} ($0,35 \mu\text{M}$) und EC_{50} -Ratio ($0,5$) für GCV und zeigt in der Dosis-Wirkungs-Kurve ebenfalls einen steilen Abfall des Virustiters an (siehe Abb. 16F).

UL54-F861Y lässt mit $0,53 \mu\text{M}$ eine etwas höhere EC_{50} für GCV verzeichnen als UL54-N855I, allerdings ist sie ebenfalls geringer als die des WT. Die berechnete EC_{50} -Ratio von $0,76$ weist auf eine GCV-Sensitivität hin (siehe Abb. 16G).



Fortsetzung auf Seite 53

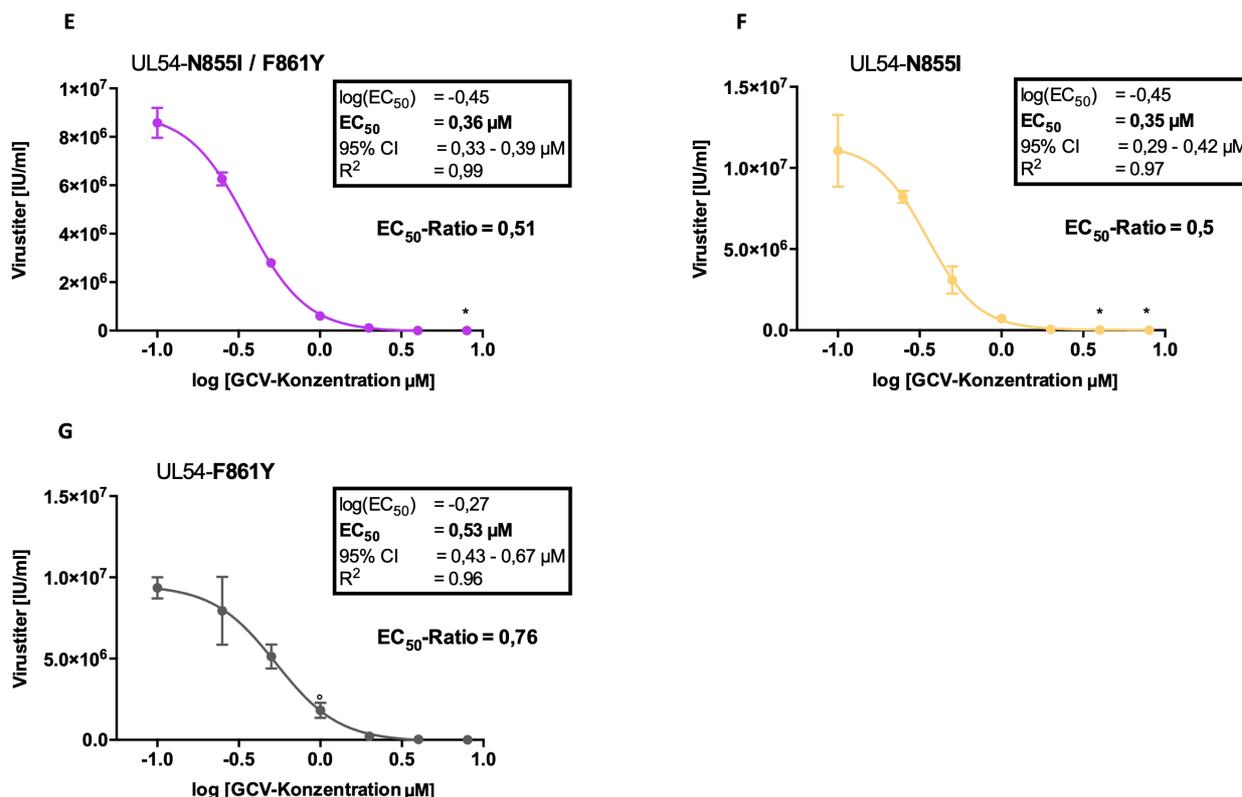


Abb. 16: Dosis-Wirkungs-Kurven der HCMV-Mutanten mit EC_{50} und EC_{50} -Ratio für GCV

Die Dosis-Wirkungs-Kurven stellen die Inhibition der viralen Replikation in Abhängigkeit der GCV-Konzentration (log [0 / 0,25 / 0,5 / 1 / 2 / 4 / 8 μM]) dar. Je steiler der Abfall der Kurven, desto geringer ist die für eine Reduktion des Virustiters benötigte GCV-Konzentration. Der Assay und die Titerung wurden jeweils in biologischen Triplikaten durchgeführt, die Symbole der Kurven entsprechen den Mittelwerten. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung (SD) dar. Die Berechnung der EC_{50} (Mittelwert der Triplikate) erfolgte mittels nicht-linearer Regressionsanalyse in GraphPadPrism (Analysetool „Inhibitor vs. Response - Variable Slope 4 parameters“). EC_{50} = halbmaximale effektive Konzentration; R^2 = Determinationskoeffizient; 95% CI = 95% Konfidenzintervall. * Einzelne Replikate ergaben Minuswerte, die nicht berücksichtigt wurden. ° einzelnes Replikat mit ungültiger Messung, Mittelwert aus biologischen Duplikaten.

3.2.4.2 FOS-Suszeptibilität der HCMV-Mutanten

Die Dosis-Wirkungs-Kurve des Wildtyps zeigt eine sigmoidale Form mit steilem Abfall des viralen Titers unter steigender FOS-Konzentration (siehe Abb. 17A). Die EC_{50} beträgt 38,01 μM .

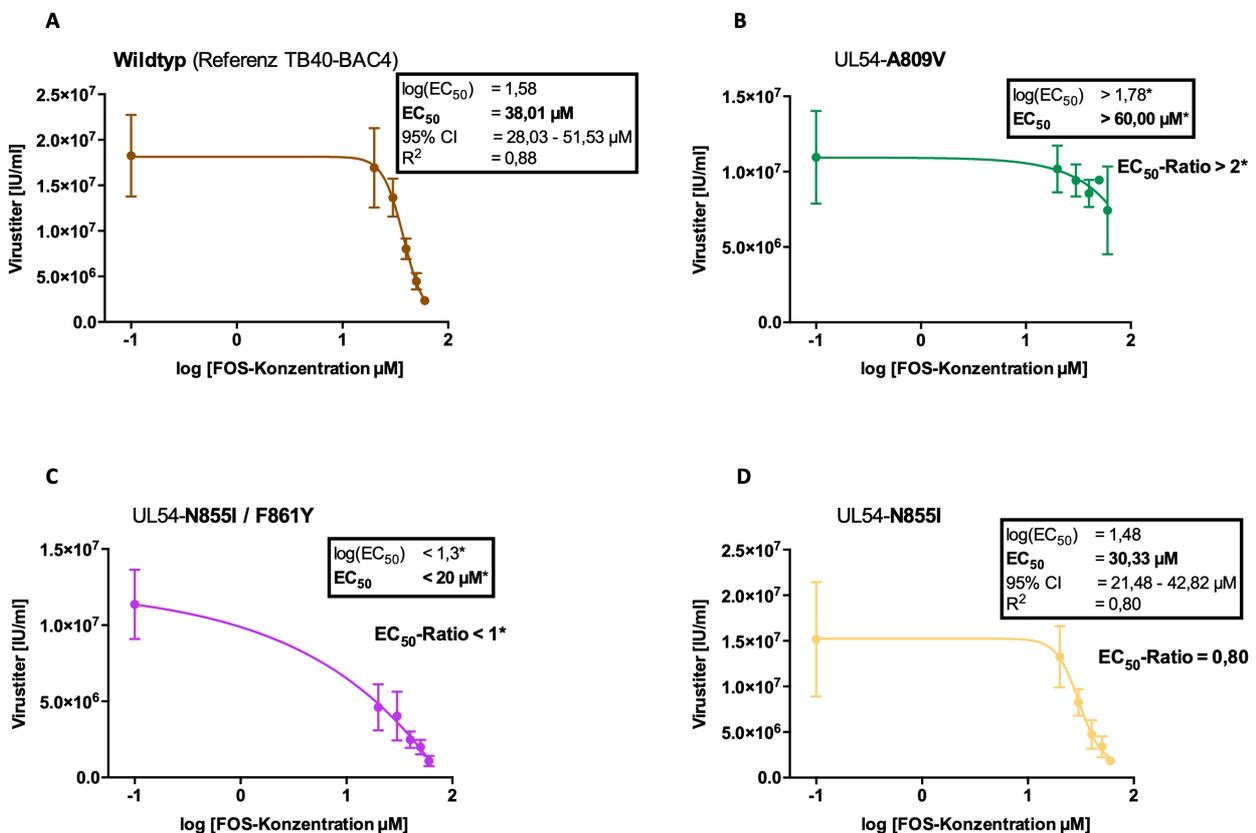
Für die UL54-Referenzmutante A809V, welche als resistenzvermittelnd gegenüber FOS beschrieben ist (68, 136), zeigt sich eine verminderte FOS-Suszeptibilität durch eine abgeflachte und unvollständige Abnahme des Virustiters bei steigender FOS-Konzentration (siehe Abb. 17B). Es kann keine verlässliche EC_{50} berechnet werden, da die maximale getestete FOS-Konzentration (60 μM) nicht ausreicht, um den Virustiter der

HCMV-Mutante UL54-A809V halbmaximal (50%) zu inhibieren. Am Verlauf der Dosis-Wirkungs-Kurve lässt sich jedoch eine hochgradige Resistenzvermittlung mit einer $EC_{50} > 60 \mu\text{M}$ vermuten.

Für die zu phänotypisierende UL54-Doppelmutante N855I/F861Y ist ebenfalls keine zuverlässige Berechnung einer EC_{50} möglich, da der Virustiter mit der niedrigsten verwendeten FOS-Konzentration ($20 \mu\text{M}$) bereits um mehr als 50% inhibiert wird. Es kann daher eine $EC_{50} < 20 \mu\text{M}$ geschätzt werden. Der sehr steile Abfall der Dosis-Wirkungs-Kurve unterstützt diese Annahme zusätzlich und weist auf eine hohe FOS-Suszeptibilität hin (siehe Abb. 17C).

Die Einzelmutation UL54-N855I deutet mit einer steilen Regression der sigmoidalen Kurve und einer EC_{50} von $30,33 \mu\text{M}$ und EC_{50} -Ratio von 0,80 auf eine FOS-Sensitivität hin (siehe Abb. 17D).

Die Kurve der HCMV-Mutante UL54-F861Y zeigt ebenfalls eine sigmoidale Form, die EC_{50} von $23,91 \mu\text{M}$ und EC_{50} -Ratio von 0,63 sprechen für eine FOS-Sensitivität (siehe Abb. 17E).



Fortsetzung auf Seite 55

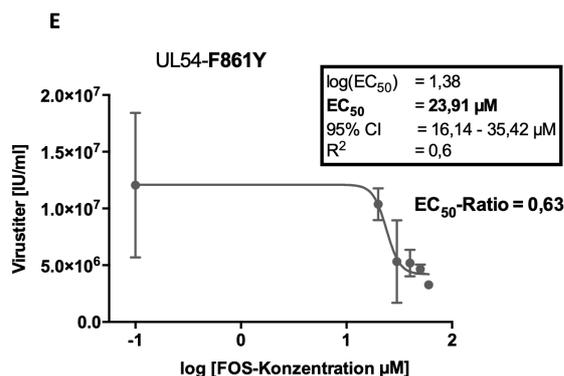


Abb. 17: Dosis-Wirkungs-Kurven der HCMV-Mutanten mit EC_{50} für FOS

Die Dosis-Wirkungs-Kurven stellen die Inhibition der viralen Replikation in Abhängigkeit der FOS-Konzentration (log [0 / 20 / 30 / 40 / 50 / 60 μM]) dar. Je steiler der Abfall der Kurven, desto geringer ist die für eine Reduktion des Virustiters benötigte FOS-Konzentration. Der Assay und die Titerung wurden jeweils in biologischen Triplikaten durchgeführt, die Symbole der Kurven entsprechen den Mittelwerten. Die Fehlerbalken stellen die SD dar. EC_{50} = halbmaximale effektive Konzentration; R^2 = Determinationskoeffizient; 95% CI = 95% Konfidenzintervall. * *geschätzter Wert, da keine genaue EC_{50} -Berechnung möglich (siehe dazu auch 4.2.2)*

3.2.4.3 Gegenüberstellung der Ergebnisse des Titer-Reduktions-Assays und des Plaque-Reduktions-Assays

Um die Ergebnisse des erstmalig etablierten Titer-Reduktions-Assays per durchflusszytometrischer Immunotitration (TRA) mit denen eines Plaque-Reduktions-Assays (PRA) als Goldstandard der phänotypischen Resistenztestung abzugleichen, wurden die generierten HCMV-Mutanten in das Konsiliarlabor nach Tübingen geschickt und dort mittels modifiziertem PRA (130) in biologischen Triplikaten auf GCV- und FOS-Suszeptibilität untersucht. Da sich die beiden Assays in ihrem Prinzip und der Durchführung (z.B. Verwendung unterschiedlicher Virostatika-Konzentrationsbereiche) unterscheiden, wurde die EC_{50} -Ratio für eine bessere Vergleichbarkeit herangezogen. Aus Abbildung 18 sowie Tabelle 20 und 21 lässt sich entnehmen, dass die mittels TRA und PRA ermittelten EC_{50} -Ratios für die jeweiligen HCMV-Mutanten voneinander abweichen. Bezüglich der GCV-Suszeptibilität lässt sich im TRA und PRA jedoch eine konsistente Rangfolge der HCMV-Mutanten untereinander erkennen. Demnach ist die Referenzmutante UL97-M460I als am schwächsten GCV-suszeptibel einzuordnen, gefolgt von UL54-A987G, UL54-F861Y, UL54-N855I/F861Y und UL54-N855I (siehe Abb. 18 und Tab. 20). Für FOS hingegen kann für beide Assays keine eindeutige übereinstimmende Rangfolge der Suszeptibilität beschrieben werden (siehe Tab. 21).

Insgesamt sind die EC_{50} -Ratios des TRA für GCV und FOS durchgehend niedriger (ca. 2-4-fach) als die des PRA, was zu unterschiedlichen Einstufungen der Virostatika-Suszeptibilität führt (siehe Tab. 20, Tab. 21).

GCV-Suszeptibilität

Anhand des TRA ist nach dem Resistenzgrenzwert (EC_{50} -Ratio ≥ 2) nur die Referenzmutante UL97-M460I als GCV-resistent einzustufen. Die Referenzmutante UL54-A987G weist zwar eine EC_{50} -Ratio >1 auf, nach dem Resistenzgrenzwert ist sie aber, wie auch die zu phänotypisierenden HCMV-Mutanten, als GCV-sensitiv einzuordnen.

Anhand des PRA sind die Referenzmutanten UL97-M460I und UL54-A987G sowie die zu phänotypisierende Einzelmutante UL54-F861Y als GCV-resistent einzustufen, während die zu phänotypisierende Doppelmutante UL54-N855I/F861Y und Einzelmutante UL54-N855I als GCV-sensitiv zu beschreiben sind.

FOS-Suszeptibilität

Nach dem TRA kann eine hochgradige Resistenz für die Referenzmutante UL54-A809V angenommen werden, die zu phänotypisierenden HCMV-Mutanten sind als FOS-sensitiv einzuordnen.

Anhand der mit dem PRA ermittelten EC_{50} -Ratio lässt sich die Referenzmutante UL54-A809V als hochgradig FOS-resistent einstufen. Die zu phänotypisierenden HCMV-Mutanten UL54-N855I/F861Y und UL54-F861Y sind mit EC_{50} -Ratios knapp oberhalb der Resistenzschwelle ebenfalls als FOS-resistent einzuordnen. Die Einzelmutante UL54-N855I zeigt sich im PRA als FOS-sensitiv.

Insgesamt weichen die Ergebnisse des PRA für die GCV- und FOS-Suszeptibilität untereinander teilweise stark voneinander ab (Abb. 18), was sich in einem breiten 95%-Konfidenzintervall widerspiegelt (siehe Tab. 20 und Tab. 21)

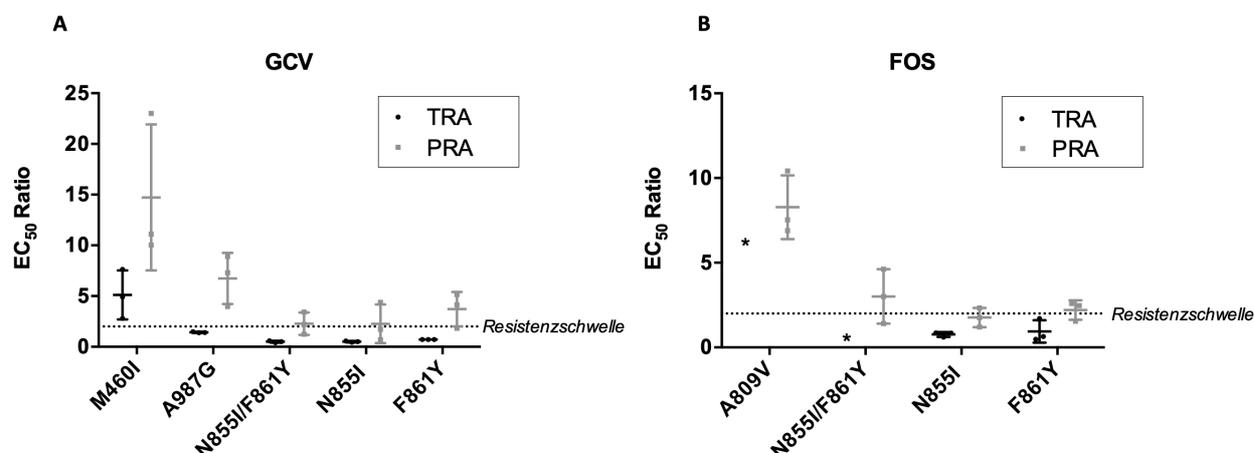


Abb. 18: Vergleich der anhand des TRA und PRA ermittelten EC_{50} -Ratios

Für die Gegenüberstellung der Ergebnisse des TRA und PRA sind die in biologischen Triplikaten ermittelten EC_{50} Ratios (EC_{50} Mutante \div EC_{50} Wildtyp) für die jeweiligen HCMV-Mutanten als Symbole und deren Standardabweichung (SD) als Fehlerbalken dargestellt. (A) EC_{50} -Ratios GCV; (B) EC_{50} -Ratios FOS; * geschätzter Wert, da keine genaue EC_{50} -Berechnung möglich.

Tab. 20: Übersicht der anhand des TRA und PRA ermittelten EC_{50} -Werte und EC_{50} -Ratios für GCV

Mutation	GCV EC_{50} [μ M] ^a		95%CI [μ M]		EC_{50} -Ratio ^b	
	TRA	PRA	TRA	PRA	TRA	PRA
UL967-M460I	3,73	24,69	0,70- 20,05	12,84-36,53	5,33^c	12,79^c
UL54-A987G	0,96	12,24	0,68-1,36	-2,37-26,85	1,37	6,34^c
UL54-A809V	0,68	-	0,46-1,01	-	0,97	-
UL54-N855I/F861Y	0,36	3,78	0,33-0,39	1,98-5,57	0,51	1,96
UL54-N855I	0,35	3,29	0,30-0,42	0,15-6,43	0,50	1,70
UL54-F861Y	0,53	6,26	0,43-0,67	1,0-11,51	0,76	3,24^c
<i>TB40-BAC4 Wildtyp</i>	<i>0,70</i>	<i>1,93</i>	<i>0,59-0,82</i>	<i>-0,22-4,09</i>	<i>(1)</i>	<i>(1)</i>

Anmerkung: Alle Werte sind auf 2 Dezimalstellen hinter dem Komma gerundet

- nicht getestet; ^a Mittelwert aus biologischen Triplikaten; ^b EC_{50} Mutante \div EC_{50} Wildtyp; ^c GCV-Resistenz (Grenzwert: EC_{50} -Ratio \geq 2)

Tab. 21: Übersicht der anhand des TRA und PRA ermittelten EC₅₀-Werte und EC₅₀-Ratios für FOS

Mutation	FOS EC ₅₀ [µM] ^a		95%CI [µM]		EC ₅₀ -Ratio ^b	
	TRA	PRA	TRA	PRA	TRA	PRA
UL54-A809V	> 60,00*	313,2	n.a.	154,00-439,30	> 2*	7,90^c
UL54-N855I/F861Y	< 20,00*	98,85	n.a.	40,55-157,10	< 1*	2,63^c
UL54-N855I	30,33	61,34	21,48-42,82	56,90-65,77	0,80	1,63
UL54-F861Y	23,91	77,58	16,14-35,32	56,63-98,58	0,63	2,07^c
<i>TB40-BAC4 Wildtyp</i>	<i>38,01</i>	<i>37,54</i>	<i>28,03-51,53</i>	<i>3,81-71,28</i>	<i>(1)</i>	<i>(1)</i>

Anmerkung: Alle Werte sind auf 2 Dezimalstellen hinter dem Komma gerundet

* geschätzter Wert, da keine genaue EC₅₀-Berechnung möglich (siehe 4.2.2.); n.a. nicht auswertbar; ^a Mittelwert aus biologischen Triplikaten; ^b EC₅₀ Mutante ÷ EC₅₀ Wildtyp; ^c FOS-Resistenz (Grenzwert: EC₅₀-Ratio ≥ 2)

4 Diskussion

Unbeschriebene Mutationen, die in der genotypischen Resistenztestung durch Sequenzierung detektiert und hinsichtlich ihres Resistenzphänotyps nicht eingeordnet werden können, sind mit dem Risiko verbunden, die medikamentöse Therapie möglicherweise zu voreilig oder zu spät umzustellen und letztlich einen schweren Verlauf einer HCMV-Erkrankung durch toxische Nebenwirkungen der Virostatika oder unzureichende Reduktion der Viruslast herbeizuführen (77). Jede phänotypische Charakterisierung unbeschriebener Mutationen trägt daher zu einem besseren Verständnis HCMV-spezifischer Virostatika-Resistenzen bei und ist für eine zuverlässige Einordnung detektierter Mutationen hilfreich, welche wiederum mit einer Verbesserung des Therapiemanagements verbunden sein kann (68, 69, 100).

In der vorliegenden Arbeit wurden rekombinante BAC-Mutanten mit zwei unbeschriebenen UL54-Mutationen (N855I, F861Y) eines multiresistenten klinischen HCMV-Isolats eines pädiatrischen Patienten nach SZT (siehe 1.5) generiert, in Zellkultur als infektiöses Virus rekonstituiert und phänotypisch hinsichtlich Wachstumsverhalten und Resistenzvermittlung gegenüber gängigen und im klinischen Fall verabreichten Virostatika (GCV, FOS) untersucht.

4.2 Wachstumsverhalten der HCMV-Mutanten

Vor der Durchführung der phänotypischen Resistenztestung wurde die Kinetik der Virusvermehrung für alle rekombinanten HCMV-Mutanten analysiert, um Fehlinterpretationen von Ergebnissen der Resistenztestung zu vermeiden und Auswirkungen der Mutationen auf die replikative Fitness zu untersuchen (siehe Abschnitt 3.2.3).

Die rekombinanten HCMV-Mutanten zeigten unter hoher MOI (2,5) eine dem HCMV-Wildtyp ähnliche Kinetik mit einem maximalen Virustiter um den 6. - 8. dpi und anschließender Plateauentwicklung, was mit den Ergebnissen für verschiedene HCMV-Mutanten aus anderen In vitro-Wachstumsanalysen mit hoher MOI einhergeht (130). Da die phänotypische Resistenztestung mittels Titer-Reduktions-Assay unter Bedingungen einer hohen MOI durchgeführt wurde, kann davon ausgegangen werden, dass die Ergebnisse nicht durch Einschränkungen der Virusreplikation einzelner HCMV-Mutanten beeinträchtigt wurden.

Unter niedriger MOI (0,02) ließ sich für alle HCMV-Mutanten eine leichte Einschränkung sowie Verzögerung der Virusreplikation erkennen. So erreichte die Virusvermehrung des HCMV-Wildtyps unter Bedingungen einer niedrigen MOI um den 16. dpi den Höhepunkt, während die Virustiter der HCMV-Mutanten langsamer zunahm und ab dem 16. dpi zwar abflachten, eine leichte Zunahme aber noch bis zum 20. dpi zu erkennen war. Insgesamt erreichte nach 20 dpi keine HCMV-Mutante den maximalen Virustiter des Wildtyps.

Die stärkste Einschränkung der Virusvermehrung zeigte sich bei der UL97-Referenzmutation M460I. Hier war die maximale Wachstumskapazität nach 20 dpi um $1.5 \log_{10}$ -Einheiten niedriger als die des HCMV-Wildtyps. Da der UL97-Kinase eine wichtige Funktion für die virale Replikation zugeschrieben wird, liegt es nahe, dass Mutationen in der Kinase-Domäne von pUL97 die Wachstumskapazität des Virus vermindern können, womit das beobachtete Ergebnis unterstützt werden kann (68, 83, 88, 142). Marschall et al. konnten hingegen, trotz leichter Einschränkung der Protein-Phosphorylierungsaktivität, keinen Hinweis auf eine damit verbundene verminderte Wachstumskapazität finden (143).

Nach der HCMV-Mutante UL97-M460I zeigte die Referenzmutante UL54-A809V den zweitgeringsten maximal erreichbaren Virustiter, der ca. $1 \log_{10}$ -Einheit niedriger als der des HCMV-Wildtyps war. Dieses Ergebnis geht mit Beobachtungen vorheriger Studien einher, welche die Vermittlung eines leichten bis moderaten Defizits der Virusreplikation durch die in der funktionellen Domäne III der UL54-Polymerase liegende Mutation UL54-A809V beschreiben (124, 134, 144).

Die Replikationskinetik der Referenzmutation UL54-A987G, welche in der Region V der UL54-Polymerase lokalisiert ist, unterschied sich am geringsten vom HCMV-Wildtyp, was ebenfalls mit vorherigen Beschreibungen in der Literatur vereinbar ist (141).

Die neu detektierten, zu untersuchenden UL54-Mutationen N855I und F861Y vermittelten einzeln und in Kombination eine leicht verminderte virale Wachstumskapazität, die sich um $< 1 \log_{10}$ -Einheit vom Wildtyp unterschied. Die einzelnen Mutationen UL54-N855I und UL54-F861Y sowie die Doppelmutation UL54-N855I/F861Y lassen sich somit hinsichtlich der viralen Wachstumskapazität ungefähr zwischen den beiden UL54-Referenzmutanten einordnen. Wie bereits für andere UL54-Mutationen auch außerhalb funktioneller Domänen beschrieben, könnte die eingeschränkte Virusvermehrung auf eine verminderte Polymeraseaktivität durch die Mutationen zurückzuführen sein (97, 134, 140).

Bis heute existiert keine standardisierte Methode für die phänotypische Charakterisierung der Virusreplikation von HCMV-Mutanten, weshalb ein zuverlässiger Vergleich mit einer definitiven quantitativen Einordnung der Ergebnisse nicht möglich ist. Dafür bedarf es zukünftig neben der phänotypischen Resistenztestung auch der weiteren und häufigeren phänotypischen Charakterisierung der Replikationskinetik von HCMV-Mutanten (145).

4.2 Virostatika-Suszeptibilität der HCMV-Mutanten

Mittels phänotypischer Resistenztestung der in einem resistenten klinischen HCMV-Isolat detektierten UL54-Mutationen wurde untersucht, ob und in welchem Maß die Mutationen zum klinischen Bild einer therapierefraktären HCMV-Infektion (siehe Abschnitt 1.5) beigetragen haben könnten. Obwohl der PRA weiterhin als Goldstandard für phänotypische Resistenztestungen gilt, wurde die Virostatika-Suszeptibilität der einzelnen HCMV-Mutanten in dieser Arbeit mit einem zum ersten Mal etablierten Titer-Reduktions-Assay (*Yield Reduction Assay*) per durchflusszytometrischer Immunotitration (TRA) (siehe Abschnitt 2.2.6) untersucht. Die Wahl dieser Methode wurde aufgrund der mit dem PRA verbundenen Nachteile, wie der Arbeitsintensität und vor allem der Untersucher-abhängigen Plaqueauszählung (Subjektivität), getroffen. Beim PRA kommt es nicht selten zu stark voneinander abweichenden Ergebnissen, welche eine Standardisierung der Methode und damit zusammenhängend zuverlässige Charakterisierung von neuen Mutationen deutlich erschweren (68, 69, 89, 105, 108).

In einer Vielzahl publizierter Methoden wurde bereits versucht, den Problemen des PRA zu begegnen. So existieren einige modifizierte PRA-Protokolle (108, 130), Fluoreszenz- und Reporter-basierte Methoden (91, 109, 132) und real-time PCR-Assays (146), welche vielversprechende Alternativen zum PRA darstellen. Dennoch setzen vor allem die häufig verwendeten und etablierten Methoden die Verfügbarkeit spezieller Geräte, wie z.B. eines Chemolumineszenz-Analyse-Geräts für den SEAP-Reporter-basierten Assay (91), voraus. Ein Durchflusszytometer für Immunotitrationen ist hingegen in den meisten klinischen Laboratorien verfügbar. Ferner wurden Titer-Reduktions-Assays bereits für die phänotypische Resistenztestung von HCMV-Isolaten verwendet (147-149). Die Durchflusszytometrie-basierte Quantifizierung viraler Titer ist bereits für andere Viren (z.B. Influenza- und Adenoviren) erprobt (119-121) und findet auch im Rahmen der HCMV-Grundlagenforschung Anwendung. Der in dieser Arbeit etablierte Titer-Reduktions-Assay per durchflusszytometrischer Immunotitration (TRA) stellte daher eine

naheliegende alternative Methode dar, um die bekannten Probleme des PRA zu umgehen. Die ermittelten Ergebnisse wurden anschließend mit denen eines im Konsiliarlabor Tübingen durchgeführten PRA (130) verglichen.

4.2.1 Einordnung der GCV-Suszeptibilität anhand des Titer-Reduktions-Assays

Eine Virostatika-Resistenzvermittlung wird in vielen Studien ab einer EC_{50} -Ratio ≥ 2 angenommen (68, 77, 80, 90). Auch in dieser Arbeit wurde dieser Grenzwert für die phänotypische Einordnung der HCMV-Mutanten hinsichtlich der Virostatika-Suszeptibilität verwendet. Demzufolge sind die im HCMV-Isolat neu detektierten Mutationen UL54-N855I (EC_{50} -Ratio: 0,5) und UL54-F861Y (EC_{50} -Ratio 0,76) einzeln und in Kombination (EC_{50} -Ratio: 0,51) als GCV-sensitiv einzustufen (siehe Tab. 20, Tab. 21). Aufgrund der getesteten hochgradigen GCV-Resistenz des HCMV-Isolats entsprachen diese Ergebnisse nicht den Erwartungen, weshalb sie zunächst im Kontext der Referenzmutanten betrachtet werden müssen.

Die Referenzmutante UL97-M460I ist mit einer EC_{50} -Ratio von 5,3 im durchgeführten TRA als GCV-resistent zu charakterisieren, was mit mehrfach veröffentlichten Ergebnissen übereinstimmt (68, 133, 135), (siehe Tab. 22).

Für UL54-A987G lässt sich mit einer EC_{50} -Ratio von 1,37 eine erniedrigte GCV-Suszeptibilität knapp unterhalb der Resistenzschwelle ($EC_{50} \geq 2$) feststellen, die in der Literatur beschriebene GCV-Resistenz mit einer EC_{50} -Ratio von 5,3 (68, 136) lässt sich mit dem verwendeten TRA allerdings nicht rekonstruieren (siehe Tab. 22).

Die Mutante UL54-A809V diente primär als Referenz für eine FOS-Resistenz, in der Literatur wird jedoch auch für GCV eine EC_{50} -Ratio von 2,3 knapp oberhalb der Resistenzschwelle beschrieben (68, 136). Diese konnte in dieser Arbeit anhand des TRA nicht nachgewiesen werden (siehe Tab. 22).

Für beide UL54-Referenzmutanten kann mittels TRA also eine ca. 2-4-fach niedrigere EC_{50} -Ratio als in der Literatur beschrieben werden. Die Einstufung der Virostatika-Suszeptibilität für die neu detektierten HCMV-Mutanten anhand des in anderen Publikationen angewendeten Resistenzgrenzwertes (EC_{50} -Ratio ≥ 2) ist daher kritisch zu betrachten. Es stellt sich die Frage, weshalb aus dem in dieser Arbeit durchgeführten TRA reproduzierbar niedrigere EC_{50} -Werte und EC_{50} -Ratios resultieren. Da die Referenzwerte der Literatur auf Ergebnissen durchgeführter PRA beruhen (68), wird im Abschnitt 4.2.4 auf denkbare Unterschiede der Methoden eingegangen, die zu differenten Ergebnissen geführt haben könnten.

4.2.2 Einordnung der FOS-Suszeptibilität anhand des Titer-Reduktions-Assays

Für die Referenzmutante UL54-A809V und die Doppelmutante UL54-N855I/F861Y konnte mit dem durchgeführten TRA keine EC_{50} für FOS ermittelt werden, da der festgelegte Konzentrationsbereich für eine EC_{50} -Bestimmung nicht ausreichte. Die höchste gewählte FOS-Konzentration von 60 μM konnte keine halbmaximale Inhibition des Virustiters von UL54-A809V hervorbringen (siehe Abb. 17B). Invers verhielt es sich bei der zu phänotypisierenden Doppelmutante. Hier konnte keine EC_{50} festgelegt werden, da bereits die niedrigste FOS-Konzentration von 20 μM einen um mehr als 50% reduzierten Virustiter bedingte (siehe Abb. 17C). Für die zuverlässige Ermittlung der EC_{50} wird ein Konzentrationsbereich des Virostatikums benötigt, der mindestens zwei Konzentrationen beinhaltet, welche Virustiter erzeugen, die vor und hinter dem Wendepunkt zwischen oberem und unterem geschätzten Plateau auf der sigmoidalen Kurve liegen (150, 151). Es wäre daher nötig gewesen, einen breiteren Konzentrationsbereich mit noch höheren und niedrigeren FOS-Konzentrationen im TRA anzuwenden, um eine genaue EC_{50} zu definieren. Dennoch geben die Dosis-Wirkungs-Kurven anhand ihres Verlaufs Aufschluss über die FOS-Suszeptibilität der genannten Mutanten und lassen eine ungefähre phänotypische Einordnung zu. Die Referenzmutante UL54-A809V ist demnach als FOS-resistent zu charakterisieren, was mit publizierten Beschreibungen einhergeht (68, 136), und die zu phänotypisierende Doppelmutante UL54-N855I/F861Y ist als FOS-sensitiv einzustufen.

Für die einzelnen neu detektierten HCMV-Mutationen UL54-N855I und UL54-F861Y wurden EC_{50} -Ratios von 0,80 und 0,63 ermittelt, weshalb beide Mutationen nach dem TRA als FOS-sensitiv einzuordnen sind. Wie bereits für die GCV-Suszeptibilität beschrieben, ist jedoch auch hier die Anwendung des konventionellen Resistenzgrenzwertes für die Einordnung der FOS-Suszeptibilität in Frage zu stellen und wird im Abschnitt 4.2.4 bei der Gegenüberstellung der Ergebnisse von TRA und PRA aufgegriffen.

Tab. 22: EC₅₀-Ratios von TRA und PRA im Vergleich mit Angaben der Literatur

Mutation	EC ₅₀ -Ratio ^b TRA		EC ₅₀ -Ratio ^b PRA		EC ₅₀ -Ratio Literatur ^c	
	GCV	FOS	GCV	FOS	GCV	FOS
	UL97-M460I	5,33^d	-	12,79^d	-	5^d
UL54-A987G	1,37	-	6,34^d	-	5,3^d	1,2
UL54-A809V	0,97	> 2^{*;d}	-	7,90^d	2,6^d	6,3^d
UL54-N855I/F861Y	0,51	< 1 [*]	1,96	2,63^d	-	-
UL54-N855I	0,5	0,8	1,70	1,63	-	-
UL54-F861Y	0,76	0,63	3,24^d	2,07^d	-	-

Anmerkung: Alle Werte sind auf 2 Dezimalstellen hinter dem Komma gerundet

^{*} geschätzter Wert, da keine genaue EC₅₀-Berechnung möglich; - nicht getestet; ^b EC₅₀ Mutante ÷ EC₅₀ Wildtyp (da sich die EC₅₀-Ratios aus den EC₅₀-Mittelwerten errechnen, sind sie vor dem Hintergrund des z.T. sehr großen 95% CI zu betrachten (siehe Tab. 20 und 21)); ^c Referenzliteratur: (68, 133, 135, 136); ^d GCV-/FOS-Resistenz (Grenzwert: EC₅₀ Ratio ≥ 2)

4.2.3 Einordnung der Virostatika-Suszeptibilität anhand des Plaque-Reduktions-Assays

Für eine bessere Einschätzung der Ergebnisse des TRA wurden diese mit einem extern durchgeführten PRA in Tübingen verglichen (siehe Abschnitt 3.2.4.3).

Nach dem PRA und dem verwendeten Resistenzgrenzwert (EC₅₀-Ratio ≥ 2) zu urteilen, sind die Referenzmutanten UL97-M460I und UL54-A987G als GCV-resistent einzustufen, was mit den Angaben der Literatur übereinstimmt. Die EC₅₀-Ratio von UL97-M460I ist mit 12,79 allerdings mehr als doppelt so hoch wie in vorherigen Publikationen beschrieben (68), (siehe Tab. 22). Größere Abweichungen werden für den PRA häufig beobachtet und sind mehrfach in Publikationen beschrieben worden (67-69, 90, 105). Das bekannte Problem der eingeschränkten Reproduzierbarkeit kann mit diesen Ergebnissen daher nochmals verdeutlicht werden.

Auch die FOS-Resistenz der Referenzmutante UL54-A809V konnte mit dem PRA bestätigt werden, wobei hier ebenfalls eine leicht höhere EC₅₀-Ratio als in der Literatur beschrieben ermittelt wurde (68, 136), (siehe Tab. 22).

Von den neu detektierten UL54-Mutanten zeigte sich die Doppelmutante UL54-N855I/F861Y im PRA als GCV-sensitiv und FOS-resistent. Die Einzelmutante UL54-F861Y ist anhand des PRA als GCV- und FOS-resistent einzuordnen, während UL54-N855I als GCV- und FOS-sensitiv einzustufen ist.

Nach den Ergebnissen des PRA könnte man schlussfolgern, dass die Einzelmutation UL54-F861Y den im klinischen Isolat getesteten Resistenzphänotypen bedingt haben könnte. Dagegen spricht allerdings, dass die EC_{50} -Ratio nur knapp über dem Resistenzgrenzwert (EC_{50} -Ratio ≥ 2) liegt und die EC_{50} -Ratio der Referenzmutationen deutlich darüber (siehe Tab. 22). Ferner weichen die mittels PRA in Triplikaten ermittelten EC_{50} -Werte für die jeweiligen HCMV-Stämme teilweise bedeutend voneinander ab (siehe Abb. 18, Tab. 20 und Tab. 21). Würde man beispielsweise für den Wildtyp die EC_{50} der oberen 95% CI-Begrenzung für die Bestimmung der EC_{50} -Ratios heranziehen, so wären die neu detektierten UL54-Mutationen einzeln und in Kombination als GCV- und FOS-sensitiv einzustufen und entsprächen damit den Ergebnissen des TRA. Die errechnete EC_{50} als Mittelwert der drei Versuche im PRA ist demnach hinsichtlich ihrer Aussagekraft kritisch zu hinterfragen und damit auch die EC_{50} -Ratio, welche die Mutation letztlich als sensitiv oder resistent charakterisiert. Eine höhere Anzahl an Testungen könnte hier die Zuverlässigkeit erhöhen und eine sichere Einordnung der Ergebnisse ermöglichen.

4.2.4 Mögliche Einflussfaktoren der unterschiedlichen Methoden auf die Ergebnisse der Resistenztestung

Die Ergebnisse des PRA stützen die Beobachtung aus der Gegenüberstellung von Ergebnissen des TRA mit der Referenzliteratur, dass mittels neu etabliertem TRA insgesamt niedrigere EC_{50} -Werte und EC_{50} -Ratios ermittelt werden.

Für diese Beobachtung sind mehrere Ursachen vorstellbar, wie z.B. unterschiedliche Zelltypen, Zellzyklusphasen, MOI-Bedingungen oder Unterschiede hinsichtlich der Virostatika-Applikation (siehe Abb. 19). Zunächst erscheint es sinnvoll, die unterschiedlichen Zellkulturbedingungen als Einflussfaktor auf die phänotypische Resistenztestung anzuführen. Die Verwendung verschiedener Zelllinien kann allein unterschiedliche Ergebnisse zweier Versuche mit ansonsten identisch durchgeführter Methode bedingen. So haben Chou et. al höhere EC_{50} -Werte für Maribavir in Assays mit Vorhautfibroblasten (HFF) als mit Lungenfibroblasten (HEL) ermitteln können (152). Diese Beobachtung könnte auch für die durchweg geringeren EC_{50} -Werte für GCV und FOS im verwendeten TRA mit HEL-Zellen im Vergleich zu höheren EC_{50} -Werten im PRA aus Tübingen mit HFF- und ARPE-Zellen übertragbar sein. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass metabolische Prozesse in unterschiedlichen Zellkulturen variieren, wie z.B. die Phosphorylierungsaktivität von zellulären Kinasen oder die intrazelluläre Konzentration von konkurrierenden dNTP, und so wiederum die Wirkung von GCV

beeinflussen (153). Hier ist zusätzlich zu den unterschiedlich verwendeten Zelllinien auch die Teilungsfähigkeit der Zellen in beiden Assays zu beleuchten, welche die Konzentration von intrazellulären dNTP beeinflusst. In sich nicht-teilenden Zellen ist die dNTP-Hydrolaseaktivität des zellulären Enzyms SAMHD1 erhöht (154-156). So liegen intrazellulär weniger dNTP-Moleküle vor, welche mit GCV-TP um den Einbau in den wachsenden viralen DNA-Strang konkurrieren und damit die Wirksamkeit von GCV herabsetzen können. Daraus könnte man schließen, dass GCV im TRA mit konfluent gewachsenen Zellen, die in der G₀-Phase des Zellzyklus ruhen, eine größere Wirksamkeit hatte als im PRA, welcher mit noch proliferierenden Zellen durchgeführt wurde (siehe Abb. 19). Die Beschreibung von Ordonez et al., dass Nukleosid-Analoga, wie GCV und ACV, in differenzierten Zellen mit aktivem SAMHD1 und daraus resultierenden geringeren dNTP-Konzentrationen eine stärkere antivirale Aktivität (anti-HIV) aufweisen, unterstützt die angebrachte These (157). Der naheliegende Verdacht, dass SAMHD1 auch GCV als Nukleosid-Analogon spalten und damit GCV in ruhenden Zellen letztlich wieder weniger wirksam sein könnte, wird durch Beobachtungen von Ordonez et al. (157), Coggins et al. (154) und Huber et. al. (158) entkräftet. Sie stellen fest, dass GCV durch SAMHD1 signifikant weniger hydrolysiert wird als zelluläre dNTP. Ein weiterer Erklärungsansatz für den insgesamt geringeren notwendigen Virostatika-Konzentrationsbereich im TRA und dementsprechend niedrigere EC₅₀-Werte, ist in der Handhabung des Mediumwechsels inklusive der Virostatika-Applikation zu finden. Nach Infektion der Zellen und initialer Hinzugabe der jeweiligen Virostatika in verschiedenen Konzentrationen, wurde im TRA alle zwei Tage die Hälfte des Mediums durch frisches Medium inklusive Virostatikum ersetzt. Im PRA hingegen wurden die Virostatika nur einmalig zum Zeitpunkt der Infektion hinzugegeben (siehe Abb. 19). Bezieht man nun die in der Literatur beschriebene Halbwertszeit für GCV von 12-48h in einer HCMV-infizierten Fibroblastenzellkultur mit ein (159, 160), so könnte man daraus schließen, dass im PRA die initiale Hinzugabe einer höheren GCV-Konzentration (und äquivalent auch für FOS) notwendig ist, um eine ausreichende Konzentration über den Zeitraum von insgesamt 7d aufrechtzuerhalten.

Des Weiteren haben Gentry et al. (160, 161) beobachtet, dass die Anzahl von infizierten Zellen (bedingt durch die MOI) einen Einfluss auf die intrazelluläre Konzentration von aktivem GCV-Triphosphat (GCV-TP) hat und erklären dies mit der Fähigkeit ausschließlich infizierter Zellen, GCV im ersten Schritt durch die viruseigene UL97-Kinase zu phosphorylieren, während nicht-infizierte Zellen GCV lediglich

dephosphorylieren. Diese Erklärung wird durch ihre zusätzliche Beobachtung einer 2-fach geringeren HWZ in Zellkulturen mit 50% infizierten Zellen im Vergleich zu einer Zellkultur mit 100% infizierten Zellen unterstützt. Vor diesem Hintergrund erscheint es plausibel, dass die intrazelluläre Konzentration von aktivem GCV-TP im TRA mit hoher MOI höher war als die des PRA mit geringer MOI und somit für den TRA eine geringere Hinzugabe von GCV zur Abdeckung des EC_{50} -Bereichs notwendig gewesen ist. Dementsprechend wären niedrigere anhand des TRA ermittelte EC_{50} -Werte als Ergebnis nachvollziehbar.

Ein weiterer Unterschied in der Durchführung der Methoden, der für die Ergebnisdifferenzen ursächlich sein könnte, ist die zellfreie Infektion im TRA und zellbasierte Infektion im PRA (siehe Abb. 19). Bei der Infektion über zellassoziertes Virus können Zusammenschlüsse infizierter Zellen fälschlich als neu entstandene Plaques durch neu infizierte Zellen identifiziert werden, was zu einer verzerrten, überschätzten Virustiterbestimmung führen kann (108).

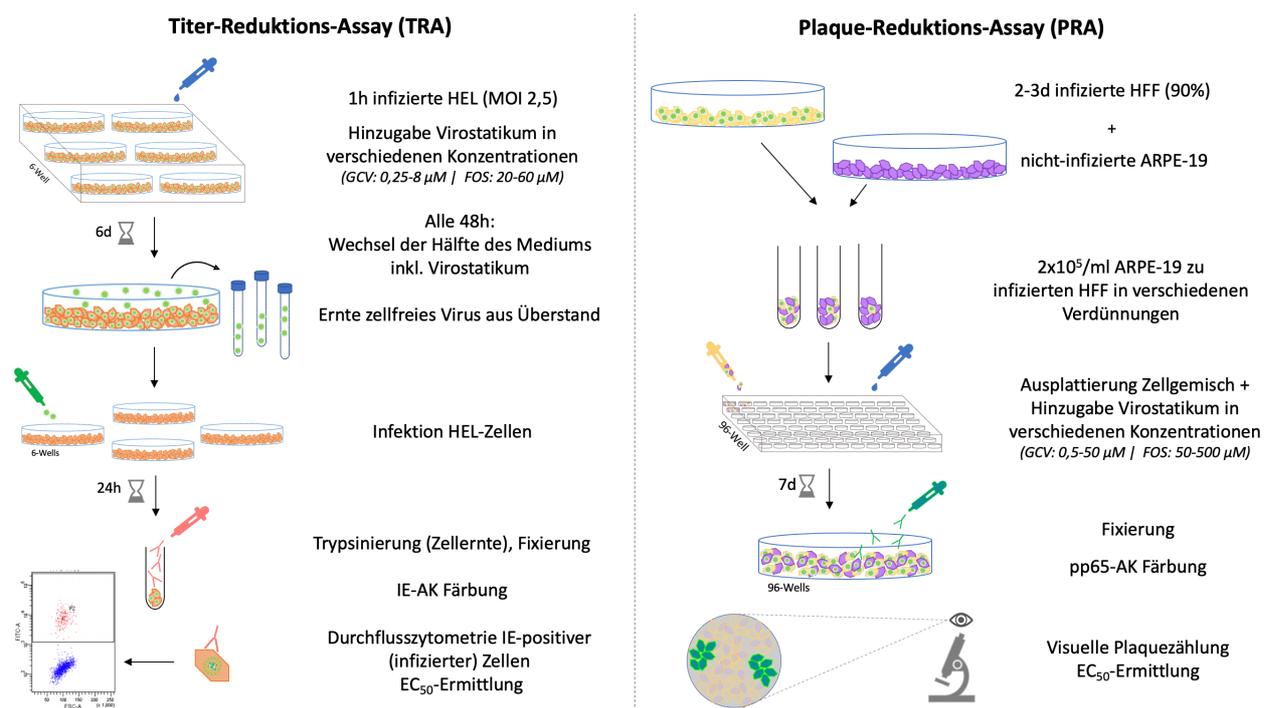


Abb. 19: Schematischer Methoden-Vergleich von TRA und PRA

Rechts: TRA: ausführliche Beschreibung siehe Abschnitt 2.2.6; Links: PRA nach (130): Humane Vorhautfibroblasten (HFF) werden mit zellfreiem Virus infiziert und bis zu einer 90%-igen Infektion des Zellmonolayers inkubiert (ca. 2-3 d). Infizierte HFF werden anschließend in verschiedenen Verdünnungen mit retinalen Pigmentepithelzellen (ARPE-19) zusammengeführt und auf 96-Well-Platten ausgeplattiert. Gleichzeitig werden Virostatika in 2-facher Verdünnungsserie hinzugegeben (0,5-50 μ M GCV, 50-500 μ M FOS). Nach 7 d folgt die Fixierung und Färbung mit einem Phosphoprotein 65-Antikörper (pp65-AK). Plaques (≥ 5 infiz. Zellen/Fokus) werden visuell ausgezählt. // Quelle: Eigene Darstellung

Alle bisher angeführten Aspekte könnten ursächlich für geringere EC_{50} -Werte des verwendeten TRA sein, jedoch erklären sie nicht die abweichenden EC_{50} -Ratios. Daher muss weitergehend das Prinzip der beiden Methoden genauer betrachtet werden. Mittels PRA wird infektiöses Virus über infizierte Zellen, die ihre Form verändern und sich dann als sichtbare Plaques zusammenschließen, quantifiziert (106). Die Plaques werden visuell anhand bestimmter Grenzwerte (≥ 5 direkt benachbarte infizierte Zellen = 1 Plaque) ausgezählt, wobei die Größe der Plaques respektive die Anzahl der infizierten Zellen pro Fokus nicht miteinbezogen wird. Mit dem verwendeten TRA werden indessen virale Titer über IE-Antigene auf infizierten Zellen per durchflusszytometrischer Immunotitration automatisiert bestimmt. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass sich mit der durchflusszytometrischen Immunotitration bereits eine geringe Replikationsinhibition in einer Abnahme des Virustiters darstellt, wohingegen sich bei der manuellen Auszählung von Plaques eine geringe Replikationsinhibition mutmaßlich nicht oder nur in einer Verkleinerung von Plaques (Anzahl von infizierten Zellen pro Fokus) oder einem verzögerten Auftreten, nicht aber in der Anzahl von Plaques und damit in der Höhe des Virustiters ausdrückt (68). Die durchflusszytometrische Immunotitration könnte demzufolge sensitiver hinsichtlich geringerer Einschränkungen der viralen Replikation durch Virostatika sein. Diese Vermutung wurde bereits in anderen fluoreszenzbasierten und real-time-PCR-basierten Assays geäußert, wo sich ebenso niedrigere EC_{50} -Werte als im PRA zeigten (132, 146). Für höhere EC_{50} -Ratios im PRA spricht in diesem Kontext die Beobachtung, dass virale Titer von resistenten HCMV-Stämmen, insbesondere bei niedrigen Virostatika-Konzentrationen, im PRA überschätzt werden (105). Infolgedessen könnten im Verhältnis zum Wildtyp höhere virale Titer und EC_{50} -Werte für resistente HCMV-Stämme ermittelt werden, die letztlich eine höhere EC_{50} -Ratio im PRA bedingen.

4.2.5 Korrelation der Ergebnisse mit dem klinischen Resistenzphänotyp

Insgesamt lässt sich das klinische Bild einer hochgradig therapierefraktären HCMV-Infektion, welches durch eine persistierend hohe und immer wieder ansteigende HCMV-Last unter virostatischer Therapie gekennzeichnet war, weder mit den Ergebnissen des TRA, noch mit Ergebnissen des PRA ausreichend erklären. Es wurde bereits in vorherigen Untersuchungen beobachtet, dass sich im Rahmen einer klinischen Therapierefraktärität neu detektierte Mutationen in der nachfolgenden phänotypischen Resistenztestung häufig als Polymorphismen ohne die erwartete erhöhte EC_{50} und EC_{50} -Ratio zeigten (67, 97). Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass das Therapieversagen

nicht durch Virostatika-resistente HCMV-Populationen verursacht wird, sondern in der stark eingeschränkten Immunfunktion betroffener Patient*innen begründet liegt, welche sogar die Kontrolle von Virostatika-sensitiven HCMV-Populationen mit einfachen Polymorphismen unmöglich macht (67, 97, 100). Ein weiterer Aspekt, der die mögliche Diskonkordanz eines therapierefraktären Verlaufs und Virostatika-sensitiven Phänotyps detektierter HCMV-Mutanten unterstreicht, ist die ungleichmäßige Verteilung von HCMV-Subpopulationen mit unterschiedlichen Resistenzmustern in verschiedenen Kompartimenten des Körpers (z.B. Urin, Blut, Liquor) (67, 69, 162). Ferner können allein durch die Isolation verschiedene HCMV-Stämme selektiert werden, wodurch das HCMV-Isolat in vitro nicht mehr die gesamte Zusammensetzung von allen HCMV-Subpopulationen in vivo widerspiegelt (128, 163).

Gegen die genannten Erklärungsansätze spricht allerdings, dass das klinische HCMV-Isolat, in welchem die UL54-Mutationen detektiert wurden, mittels zellassoziertem PRA als hochgradig GCV- und mäßig FOS-resistent getestet wurde (siehe Abschnitt 3). Das bedeutet, dass die therapierefraktäre HCMV-Infektion mit dem Phänotyp des HCMV-Isolats vereinbar ist, die Ergebnisse des TRA und des PRA damit jedoch nicht einhergehen.

Im Kontext einer Fehlersuche und unter der Annahme, dass die damalige Sanger-Sequenzierung der UL54- und UL97-Gene des HCMV-Isolats gegebenenfalls resistenzvermittelnde Mutationen als Subpopulation nicht detektieren konnte, wurde retrospektiv eine erneute Sequenzierung von UL97 und UL54 aus Plasmaproben des Patienten sowie einzelner Passagen des klinischen HCMV-Isolats veranlasst. Dabei wurden in UL97 zwei bekannte Mutationen, A594T und A591V, entdeckt. In der Literatur wird UL97-A594T als häufig in klinischen Isolaten vorkommend und mit einer EC_{50} -Ratio von 2,7 als geringgradig resistenzvermittelnd gegenüber GCV charakterisiert (68, 164, 165). UL97-A591V wurde lange als GCV-sensitiver Polymorphismus eingestuft, wobei zusätzlich beschrieben wurde, dass UL97-A591V mit anderen sensitiven Mutationen in Kombination zu einer GCV-Resistenz führen kann oder auch geringgradige Resistenzen durch UL97-A591V zu einer höhergradigen Resistenz verstärkt werden können (131, 166). Chou et. al konnten mittlerweile feststellen, dass auch UL97-A591V als Einzelmutation mit einer EC_{50} -Ratio von ca. 3,7 als geringgradig resistenzvermittelnd gegenüber GCV charakterisiert werden kann (153). Es ist bekannt, dass sich UL54-Mutationen häufig zusätzlich zu bereits vorhandenen UL97-Mutationen entwickeln (80, 87, 91, 92). Zudem wird vermutet, dass geringgradig resistenzvermittelnde Mutationen,

wie UL97-A594T und UL97-A591V, unter oraler GCV-Therapie entstehen und für neue hochgradig resistenzvermittelnde Mutationen prädisponieren (92, 166). Außerdem konnte im klinischen Kontext sowie in vitro beobachtet werden, dass die Verabreichung von ACV eine GCV-Resistenz bedingen kann (167, 168). Für den vorliegenden klinischen Fall (siehe Abschnitt 1.5) ist daher in Betracht zu ziehen, dass sich unter der VACV-Prophylaxe oder der VGCV-Therapie die UL97-Mutationen A594T und A591V als primäre resistenzvermittelnde Mutationen gegenüber GCV und sekundär die UL54-Mutationen N855I und F861Y entwickelt haben könnten. Diese Vermutung kann durch die retrospektive Betrachtung der Sequenzierungsergebnisse zu unterschiedlichen Zeitpunkten bekräftigt werden (siehe Abb. 20). Die UL97-Mutation A591V konnte in der ersten Plasmaprobe des Patienten detektiert werden, UL97-A594T und die UL54-Mutationen traten erst in der darauffolgenden Testung auf. Da die UL54-Mutationen isoliert betrachtet nicht als hochgradig resistenzvermittelnd eingestuft werden können, ist es vorstellbar, dass vor allem die Kombination aus UL97-A594T und UL97-A591V eine GCV-Resistenzvermittlung im Patienten bestimmt hat. Die hochgradige phänotypische GCV-Resistenz im HCMV-Isolat wurde hingegen zu einem Zeitpunkt getestet, an dem die Mutation UL97-A594T nicht mehr nachweisbar war (siehe Abb. 20). Es ist daher auch denkbar, dass die neuen UL54-Mutationen in Kombination mit der UL97-Mutation A591V den Grad der Resistenzvermittlung verstärkt haben, so wie es bereits für andere Mutationen beschrieben werden konnte (62, 94, 97, 169).

Die im HCMV-Isolat getestete FOS-Resistenz kann durch die zusätzlich detektierten UL97-Mutationen jedoch nicht erklärt werden. Daher sollten die Ergebnisse des PRA, welche eine FOS-Resistenzvermittlung knapp oberhalb des Resistenzgrenzwertes für die Mutation UL54-F861Y zeigten (siehe Tab. 22), durch wiederholte Testungen überprüft werden.

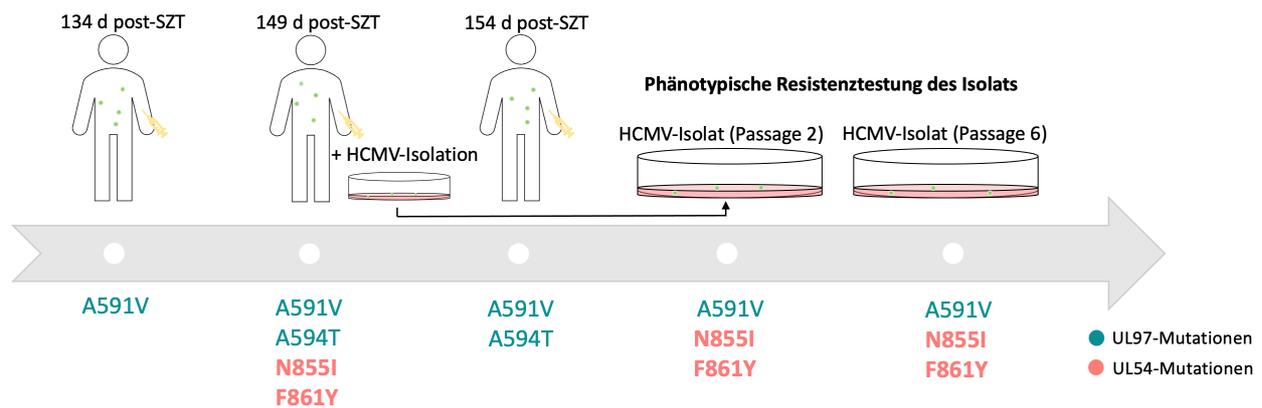


Abb. 20: Zeitlicher Verlauf der Detektion von HCMV-Mutationen in vivo und in vitro nach SZT
 Detektion von Mutationen mittels Sanger-Sequenzierung von HCMV-UL97 und HCMV-UL54 im Patientenplasma (in vivo) und im HCMV-Isolat (in vitro). post-SZT = nach allogener Stammzelltransplantation // Quelle: Eigene Darstellung

4.3 Limitationen und Kritik

Die Phänotypisierung unbeschriebener UL54-Mutationen eines resistenten klinischen HCMV-Isolats wurde mit einem Titer-Reduktions-Assay per durchflusszytometrischer Immunotitration durchgeführt. Wie für alle phänotypischen Resistenztestungen, gilt auch für die verwendete Methode, dass eine vollständige Rekonstruktion der HCMV-Infektion in vivo nicht möglich ist. Durch die Auswahl eines geeigneten BAC (TB40-BAC4), welches alle UL54-Sequenzpolymorphismen des klinischen HCMV-Isolats beherbergt, konnte der genetische Background jedoch so realitätsnah wie möglich abgebildet werden. Es ist dennoch anzunehmen, dass eine Vielzahl anderer Polymorphismen und Mutationen weiterer Gene mitunter eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von Virostatika-Resistenzen spielen können, indem sie z.B. zelluläre Stoffwechselprozesse verändern, welche wiederum die virale Replikation beeinflussen (68).

Unabhängig von der verwendeten Methode können festgelegte Schwellenwerte für phänotypische Resistenztestungen in vitro das klinische Ansprechen auf bestimmte Virostatika in vivo und den damit zusammenhängenden klinischen Verlauf nur eingeschränkt vorhersagen oder widerspiegeln. Klinische Entscheidungen, z.B. bezüglich einer Umstellung der medikamentösen Therapie, sollten daher nicht ausschließlich auf der Basis von Ergebnissen aus phänotypischen Resistenztestungen getroffen werden. Dennoch stellt die mögliche Identifikation von phänotypisch untersuchten und hinsichtlich Virostatika-Suszeptibilität eingestuft Mutationen im

Rahmen genotypischer Resistenztestungen ein bedeutsames Instrument des klinischen Therapiemonitorings refraktärer HCMV-Infektionen dar (68, 94).

Für durchflusszytometrische Analysen wird allgemein der Nachteil von störenden Hintergrundsignalen durch nicht-infizierte Zellen beschrieben (68). Die in dieser Arbeit gleichzeitig durchgeführte Analyse nicht-infizierter Zellen und Beachtung der durch diese Zellen gemessenen Signale bei der Berechnung viraler Titer konnte diesen Störfaktor jedoch minimieren.

Wie bereits im Abschnitt 4.2.2 erläutert, reichte der gewählte FOS-Konzentrationsbereich für die EC_{50} -Ermittlung für zwei HCMV-Mutanten (UL54-A809V, UL54-N855I/F861Y) nicht aus. Ein breiterer Konzentrationsbereich sollte für den TRA wiederholt getestet und etabliert werden.

Auch wenn die Ergebnisse aus biologischen Triplikaten mittels TRA reproduzierbar waren, erscheint eine Steigerung der Zuverlässigkeit der Testungen durch ≥ 3 unabhängige Versuche sinnvoll (90, 153, 170).

Für eine Einschätzung der Ergebnisse des neu etablierten TRA wurde der PRA in biologischen Triplikaten extern angefertigt. Eine abschließende Einordnung und Bewertung der Ergebnisse des TRA ist jedoch aufgrund der großen Variabilität in den einzelnen PRA-Versuchen nicht möglich. Weitere Testungen und eine Verbesserung der Vergleichbarkeit der Assays, z.B. durch die Verwendung der gleichen Zelllinie, dem Mediumwechsel inklusive der Virostatika-Applikation zu gleichen Zeitpunkten, sind erstrebenswert.

4.4. Schlussfolgerungen und wissenschaftliche Perspektiven

Mittels In vitro-Wachstumsanalyse konnte gezeigt werden, dass die UL54-Mutationen N855I und F861Y einzeln und in Kombination unter Bedingungen einer niedrigen MOI die Virusreplikation geringgradig einschränken und verzögern.

Trotz abweichender Ergebnisse von TRA und PRA kann mithilfe der Betrachtung der mitgeführten Referenzmutationen angenommen werden, dass die neu detektierten UL54-Mutationen (einzeln und in Kombination) keine hochgradige GCV- oder FOS-Resistenz vermitteln. Eine abschließende, eindeutige phänotypische Charakterisierung der neu detektierten UL54-Mutationen hinsichtlich der Virostatika-Suszeptibilität ist mit den Ergebnissen dieser Arbeit jedoch nicht möglich.

Die erst retrospektiv detektierten UL97-Mutationen und ihr Einfluss auf den sich in der Klinik gezeigten und im HCMV-Isolat getesteten Resistenzphänotypen, konnten in dieser Arbeit nicht evaluiert werden und sollten einzeln und in Kombination mit den untersuchten UL54-Mutationen Gegenstand zukünftiger phänotypischer Resistenztestungen sein.

Letztlich kann die immer häufiger beschriebene Bedeutung von Mutationskombinationen für die Entwicklung eines bestimmten Resistenzphänotypen durch diese Arbeit hervorgehoben werden (94, 131, 167). Zudem wird verdeutlicht, dass die Sanger-Sequenzierung in der Detektion von Polymorphismen und Mutationen limitiert ist und die genotypische Resistenztestung auf gründlichen Sequenzierungen aus mehreren Plasmaproben unterschiedlicher Zeitpunkte basieren sollte. Nur so können die Entwicklung resistenzvermittelnder Mutationen frühzeitig bemerkt und gegebenenfalls erforderliche Anpassungen der virostatistischen Therapie vorgenommen werden.

Um die Frage abschließend beantworten zu können, welche Mutation oder Mutationskombination im hier beschriebenen Fall zu einem Therapieversagen unter virostatistischer Therapie geführt hat und welche Rolle dabei die neu detektierten UL54-Mutationen eingenommen haben, müssen weitere HCMV-Mutanten mit verschiedenen Mutationskombinationen der genannten UL97- und UL54-Mutationen bzw. Polymorphismen generiert und phänotypisch in mehrfach unabhängigen Versuchen untersucht werden.

Es konnte gezeigt werden, dass der in dieser Arbeit neu etablierte Titer-Reduktions-Assay per durchflusszytometrischer Immuntitration (TRA) durchgehend niedrigere EC_{50} -Werte, jedoch objektivierbare und reproduzierbare Ergebnisse erzielt, was einen großen Vorteil gegenüber dem PRA darstellt. Demzufolge sollte weiterhin eruiert werden, ob der TRA weiterentwickelt und perspektivisch als zuverlässige, nicht untersucherabhängige und in vielen Laboratorien verfügbare Methode für phänotypische Resistenztestungen genutzt werden kann.

5 Literaturverzeichnis

1. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). ICTV 9th Report (2011). https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna_viruses/91/herpesviridae/ Last accessed April 25, 2021
2. Gugliesi F, Coscia A, Griffante G, Galitska G, Pasquero S, Albano C, Biolatti, M. Where do we Stand after Decades of Studying Human Cytomegalovirus? *Microorganisms*. 2020;8(5):685.
3. Landolfo S, Gariglio M, Gribaudo G, Lembo D. The human cytomegalovirus. *Pharmacology & therapeutics*. 2003;98(3):269-97.
4. Mocarski ES, Shenk T, Pass RF (2007) Cytomegaloviruses. In: Fields BN, Fields Virology, eds Knipe DM, Howley PM (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia), Chapter 69 / received full text (via researchgate) from Mocarski, Edward, August 20, 2020
5. Crough T, Khanna R. Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clinical microbiology reviews*. 2009;22(1):76-98.
6. Jean Beltran PM, Cristea IM. The life cycle and pathogenesis of human cytomegalovirus infection: lessons from proteomics. *Expert Rev Proteomics*. 2014;11(6):697-711.
7. Torres L, Tang Q. Immediate-Early (IE) gene regulation of cytomegalovirus: IE1- and pp71-mediated viral strategies against cellular defenses. *Virology*. 2014;29(6):343-52.
8. Scherer M, Schilling EM, Stamminger T. The Human CMV IE1 Protein: An Offender of PML Nuclear Bodies. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 2017;223:77-94.
9. Mocarski ES. Betaherpes viral genes and their functions. 2007. In: Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis [Internet]. Cambridge: Cambridge University Press. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK47435/#c15idc-g4p-fh7-jk0/> Last accessed April 26, 2021
10. Sinclair J, Sissons P. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J Gen Virol*. 2006;87(Pt 7):1763-79.
11. Lemmermann N, Reddehase MJ. Cytomegaloviruses : From Molecular Pathogenesis to Intervention. Norfolk, UK: Caister Academic Press; 2013.
12. Adamson CS, Nevels MM. Bright and Early: Inhibiting Human Cytomegalovirus by Targeting Major Immediate-Early Gene Expression or Protein Function. *Viruses*. 2020;12(1).

13. Kondo K, Kaneshima H, Mocarski ES. Human cytomegalovirus latent infection of granulocyte-macrophage progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(25):11879-83.
14. Taylor-Wiedeman J, Sissons JG, Borysiewicz LK, Sinclair JH. Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *J Gen Virol*. 1991;72 (Pt 9):2059-64.
15. Sinclair J. Human cytomegalovirus: Latency and reactivation in the myeloid lineage. *J Clin Virol*. 2008;41(3):180-5.
16. Zuhair M, Smit GSA, Wallis G, Jabbar F, Smith C, Devleeschauwer B, Griffiths P. Estimation of the worldwide seroprevalence of cytomegalovirus: A systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol*. 2019;29(3):e2034.
17. Voigt S, Schaffrath Rosario A, Mankertz A. Cytomegalovirus Seroprevalence Among Children and Adolescents in Germany: Data From the German Health Interview and Examination Survey for Children and Adolescents (KiGGS), 2003-2006. *Open Forum Infect Dis*. 2016;3(1):ofv193.
18. Lachmann R, Loenenbach A, Waterboer T, Brenner N, Pawlita M, Michel A, Thamm M, Poethko-Müller C, Wichmann O, Wiese-Posselt M. Cytomegalovirus (CMV) seroprevalence in the adult population of Germany. *PLoS One*. 2018;13(7):e0200267.
19. Bate SL, Dollard SC, Cannon MJ. Cytomegalovirus seroprevalence in the United States: the national health and nutrition examination surveys, 1988-2004. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2010;50(11):1439-47.
20. Cannon MJ, Schmid DS, Hyde TB. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Rev Med Virol*. 2010;20(4):202-13.
21. Lübeck PR, Doerr HW, Rabenau HF. Epidemiology of human cytomegalovirus (HCMV) in an urban region of Germany: what has changed? *Medical microbiology and immunology*. 2010;199(1):53-60.
22. Jackson JW, Sparer T. There Is Always Another Way! Cytomegalovirus' Multifaceted Dissemination Schemes. *Viruses*. 2018;10(7):383.
23. Hayes K, Danks DM, Gibas H, Jack I. Cytomegalovirus in human milk. *N Engl J Med*. 1972;287(4):177-8.
24. Hamprecht K, Jahn G. [Human cytomegalovirus and congenital virus infection]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 2007;50(11):1379-92.

25. Sinzger C, Grefte A, Plachter B, Gouw AS, The TH, Jahn G. Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. *J Gen Virol*. 1995;76 (Pt 4):741-50.
26. Britt W. Virus entry into host, establishment of infection, spread in host, mechanisms of tissue damage. In: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, Yamanishi K., editors. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge University Press 2007.; 2007, Chapter 41
27. Hamprecht K, Maschmann J, Vochem M, Dietz K, Speer CP, Jahn G. Epidemiology of transmission of cytomegalovirus from mother to preterm infant by breastfeeding. *Lancet*. 2001;357(9255):513-8.
28. Hamprecht K, Witzel S, Maschmann J, Speer CP, Jahn G. Transmission of cytomegalovirus infection through breast milk in term and preterm infants. The role of cell free milk whey and milk cells. *Adv Exp Med Biol*. 2000;478:231-9.
29. Camargo JF, Komanduri KV. Emerging concepts in cytomegalovirus infection following hematopoietic stem cell transplantation. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*. 2017;10(4):233-8.
30. Broers AE, van Der Holt R, van Esser JW, Gratama JW, Henzen-Logmans S, Kuenen-Boumeester V, Lowenberg B, Cornelissen JJ. Increased transplant-related morbidity and mortality in CMV-seropositive patients despite highly effective prevention of CMV disease after allogeneic T-cell-depleted stem cell transplantation. *Blood*. 2000;95(7):2240-5.
31. Boeckh M, Nichols WG, Papanicolaou G, Rubin R, Wingard JR, Zaia J. Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients: Current status, known challenges, and future strategies. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2003;9(9):543-58.
32. Haastrup E, Muller K, Baekgaard H, Heilmann C. Cytomegalovirus infection after allogeneic stem cell transplant in children. *Pediatr Transplant*. 2005;9(6):734-40.
33. Ljungman P. Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: viral status. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2007;20(2):209-17.
34. Cohen JI, Corey GR. Cytomegalovirus infection in the normal host. *Medicine (Baltimore)*. 1985;64(2):100-14.
35. Horwitz CA, Henle W, Henle G, Snover D, Rudnick H, Balfour HH, Jr., Mazur MH, Watson R, Schwartz B, Muller N. Clinical and laboratory evaluation of cytomegalovirus-induced mononucleosis in previously healthy individuals. Report of 82 cases. *Medicine (Baltimore)*. 1986;65(2):124-34.

36. Coll I, Sanchez C, Sierra M, Lite J, Garau J. [Spontaneous mononucleosis caused by cytomegalovirus in the immunocompetent adult]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 1995;13(4):224-8.
37. Rafailidis PI, Mourtzoukou EG, Varbobitis IC, Falagas ME. Severe cytomegalovirus infection in apparently immunocompetent patients: a systematic review. *Virology.* 2008;5:47.
38. Lancini D, Faddy HM, Flower R, Hogan C. Cytomegalovirus disease in immunocompetent adults. *The Medical journal of Australia.* 2014;201(10):578-80.
39. Sinzger C, Jahn G. Human cytomegalovirus cell tropism and pathogenesis. *Intervirology.* 1996;39(5-6):302-19.
40. Boeckh M, Leisenring W, Riddell SR, Bowden RA, Huang ML, Myerson D, Stevens-Ayers T, Flowers ME, Cunningham T, Corey L. Late cytomegalovirus disease and mortality in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants: importance of viral load and T-cell immunity. *Blood.* 2003;101(2):407-14.
41. Nichols WG, Corey L, Gooley T, Davis C, Boeckh M. High risk of death due to bacterial and fungal infection among cytomegalovirus (CMV)-seronegative recipients of stem cell transplants from seropositive donors: evidence for indirect effects of primary CMV infection. *J Infect Dis.* 2002;185(3):273-82.
42. Silasi M, Cardenas I, Kwon J-Y, Racicot K, Aldo P, Mor G. Viral infections during pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 2015;73(3):199-213.
43. Syggelou A, Iacovidou N, Kloudas S, Christoni Z, Papaevangelou V. Congenital cytomegalovirus infection. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2010;1205(1):144-7.
44. Bale JF, Jr. Human cytomegalovirus infection and disorders of the nervous system. *Arch Neurol.* 1984;41(3):310-20.
45. Einsele HE-V, Britta; Fischer, Lutz; Hamprecht, Klaus; Höcker, Britta; Hönig, Manfred; Korth, Johannes; Mertens, Thomas; Michel, Detlef; Schmidt, Barbara; Schulz, Ansgar; Sester, Martina; Stamm, Christof; Tönshoff, Burkhard; Wenzel, Jürgen; Witzke, Oliver. AWMF S2k-Leitlinie Virusinfektionen bei Organ- und allogen Stammzell-Transplantierten: Diagnostik, Prävention, Therapie. S. 61 - 83.
46. Razonable RR, Inoue N, Pinninti SG, Boppana SB, Lazzarotto T, Gabrielli L, Simonazzi G, Pellett PE, Schmid DS. Clinical Diagnostic Testing for Human Cytomegalovirus Infections. *J Infect Dis.* 2020;221(Suppl 1):S74-S85.
47. Pillet S, Roblin X, Cornillon J, Mariat C, Pozzetto B. Quantification of cytomegalovirus viral load. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2014;12(2):193-210.

48. Robert-Koch-Institut (RKI). Zytomegalievirus - Infektion - RKI Ratgeber. 2014. https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Zytomegalievirus.html#doc4738494bodyText9/ Accessed April 5, 2021.
49. Arvin A, Abendroth A. VZV: immunobiology and host response. In: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, Yamanishi, K, editors. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge 2007.
50. Barbi M, Binda S, Caroppo S. Diagnosis of congenital CMV infection via dried blood spots. *Rev Med Virol*. 2006;16(6):385-92.
51. Marsico C, Kimberlin DW. Congenital Cytomegalovirus infection: advances and challenges in diagnosis, prevention and treatment. *Ital J Pediatr*. 2017;43(1):38-.
52. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Huprikar S, Chou S, Danziger-Isakov L, Humar A, The Third International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid-organ Transplantation. *Transplantation*. 2018;102(6):900-31.
53. Griffiths PD, Stanton A, McCarrell E, Smith C, Osman M, Harber M, Davenport A, Jones G, Wheeler DC, O'Beirne J, Thorburn D, Patch D, Atkinson CE, Pichon S, Sweny P, Lanzman M, Woodford E, Rothwell E, Old N, Kinyanjui R, Haque T, Atabani S, Luck S, Prideaux S, Milne RS, Emery VC, Burroughs AK. Cytomegalovirus glycoprotein-B vaccine with MF59 adjuvant in transplant recipients: a phase 2 randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2011;377(9773):1256-63.
54. Inoue N, Abe M, Kobayashi R, Yamada S. Vaccine Development for Cytomegalovirus. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1045:271-96.
55. Gilbert GL, Hayes K, Hudson IL, James J. Prevention of transfusion-acquired cytomegalovirus infection in infants by blood filtration to remove leucocytes. Neonatal Cytomegalovirus Infection Study Group. *Lancet*. 1989;1(8649):1228-31.
56. Strauss RG. Optimal prevention of transfusion-transmitted cytomegalovirus (TTCMV) infection by modern leukocyte reduction alone: CMV sero/antibody-negative donors needed only for leukocyte products. *Transfusion*. 2016;56(8):1921-4.
57. Kotton CN. CMV: Prevention, Diagnosis and Therapy. *Am J Transplant*. 2013;13 Suppl 3:24-40; quiz
58. Ariza-Heredia EJ, Neshar L, Chemaly RF. Cytomegalovirus diseases after hematopoietic stem cell transplantation: a mini-review. *Cancer Lett*. 2014;342(1):1-8.
59. Boeckh M, Nichols WG. The impact of cytomegalovirus serostatus of donor and recipient before hematopoietic stem cell transplantation in the era of antiviral prophylaxis and preemptive therapy. *Blood*. 2004;103(6):2003-8.

60. Ljungman P, Brand R, Einsele H, Frasconi F, Niederwieser D, Cordonnier C. Donor CMV serologic status and outcome of CMV-seropositive recipients after unrelated donor stem cell transplantation: an EBMT megafile analysis. *Blood*. 2003;102(13):4255-60.
61. Kollman C, Howe CW, Anasetti C, Antin JH, Davies SM, Filipovich AH, Hegland J, Kamani N, Kernan NA, King R, Ratanatharathorn V, Weisdorf D, Confer DL. Donor characteristics as risk factors in recipients after transplantation of bone marrow from unrelated donors: the effect of donor age. *Blood*. 2001;98(7):2043-51.
62. Campos AB, Ribeiro J, Boutolleau D, Sousa H. Human cytomegalovirus antiviral drug resistance in hematopoietic stem cell transplantation: current state of the art. *Reviews in Medical Virology*. 2016;26(3):161-82.
63. Stern A, Papanicolaou GA. CMV Prevention and Treatment in Transplantation: What's New in 2019. *Curr Infect Dis Rep*. 2019;21(11):45.
64. Ljungman P, de la Camara R, Robin C, Crocchiolo R, Einsele H, Hill JA, Hubacek P, Navarro D, Cordonnier C, Ward KN, European Conference on Infections in Leukaemia g. Guidelines for the management of cytomegalovirus infection in patients with haematological malignancies and after stem cell transplantation from the 2017 European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL 7). *Lancet Infect Dis*. 2019;19(8):e260-e72.
65. Razonable RR, Humar A. Cytomegalovirus in solid organ transplant recipients- Guidelines of the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. *Clin Transplant*. 2019;33(9):e13512.
66. Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen (IQWiG). IQWiG-Berichte - Nr. 627 Letermovir (Prophylaxe einer Cytomegalievirus-Reaktivierung und -Erkrankung). 2018. https://www.g-ba.de/downloads/92-975-2297/2018-02-15_Bewertung-Therapiekosten-Patientenzahlen-IQWiG_Letermovir-D-342.pdf/ Accessed February 14, 2021
67. Michel D, Chevillotte M, Mertens T. In Reddehase MJ, Lemmermann, Niels A.W. E-Book: Cytomegaloviruses: From Molecular Pathogenesis to Intervention, Volume 2, Chapter 19, Antiviral Drug Resistance.pdf. Caister Academic Press. 2013.
68. Lurain NS, Chou S. Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23(4):689-712.
69. James SH, Prichard MN. The genetic basis of human cytomegalovirus resistance and current trends in antiviral resistance analysis. *Infect Disord Drug Targets*. 2011;11(5):504-13.
70. Poole CL, James SH. Antiviral Therapies for Herpesviruses: Current Agents and New Directions. *Clin Ther*. 2018;40(8):1282-98.

71. Huang L, Ishii KK, Zuccola H, Gehring AM, Hwang CB, Hogle J, Coen D.M. The enzymological basis for resistance of herpesvirus DNA polymerase mutants to acyclovir: relationship to the structure of alpha-like DNA polymerases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(2):447-52.
72. Khawaja F, Batista MV, El Haddad L, Chemaly RF. Resistant or refractory cytomegalovirus infections after hematopoietic cell transplantation: diagnosis and management. *Curr Opin Infect Dis*. 2019;32(6):565-74.
73. Hussein ITM, Brooks J, Bowlin TL. The discovery and development of filociclovir for the prevention and treatment of human cytomegalovirus-related disease. *Antiviral Res*. 2020;176:104710.
74. Marty FM, Winston DJ, Chemaly RF, Mullane KM, Shore TB, Papanicolaou GA, Chittick G, Brundage TM, Wilson C, Morrison ME, Foster SA, Nichols WG, Boeckh MJ. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase 3 Trial of Oral Brincidofovir for Cytomegalovirus Prophylaxis in Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2019;25(2):369-81.
75. Bogner E, Egorova A, Makarov V. Small Molecules-Prospective Novel HCMV Inhibitors. *Viruses*. 2021;13(3).
76. Kotton CN. Updates on antiviral drugs for cytomegalovirus prevention and treatment. *Curr Opin Organ Transplant*. 2019;24(4):469-75.
77. Chemaly RF, Chou S, Einsele H, Griffiths P, Avery R, Razonable RR, Mullane KM, Kotton C, Lundgren J, Komatsu TE, Lischka P, Josephson F, Douglas CM, Umeh O, Miller V, Ljungman P. Definitions of Resistant and Refractory Cytomegalovirus Infection and Disease in Transplant Recipients for Use in Clinical Trials. *Clin Infect Dis*. 2019;68(8):1420-6.
78. López-Aladid R, Guiu A, Mosquera MM, López-Medrano F, Cofán F, Linares L, Torre-Cisneros J, Vidal E, Moreno A, Aguado JM, Cordero E, Martín-Gandul C, Carratalá J, Sabé N, Niubó J, Cervera C, Capón A, Cervilla A, Santos M, Bodro M, Muñoz P, Fariñas MC, Antón A, Aranzamendi M, Montejo M, Pérez-Romero P, Len O, Marcos M. Improvement in detecting cytomegalovirus drug resistance mutations in solid organ transplant recipients with suspected resistance using next generation sequencing. *PloS one*. 2019;14(7):e0219701.
79. Drew WL. Cytomegalovirus Resistance Testing: Pitfalls and Problems for the Clinician. *Clinical Infectious Diseases*. 2010;50(5):733-6.
80. Chou S. Antiviral drug resistance in human cytomegalovirus. *Transpl Infect Dis*. 1999;1(2):105-14.
81. Boivin G, Goyette N, Rollag H, Jardine AG, Pescovitz MD, Asberg A, Ives J, Hartmann A, Humar A. Cytomegalovirus resistance in solid organ transplant recipients treated with intravenous ganciclovir or oral valganciclovir. *Antivir Ther*. 2009;14(5):697-704.

82. Littler E, Stuart AD, Chee MS. Human cytomegalovirus UL97 open reading frame encodes a protein that phosphorylates the antiviral nucleoside analogue ganciclovir. *Nature*. 1992;358(6382):160-2.
83. Michel D, Pavić I, Zimmermann A, Haupt E, Wunderlich K, Heuschmid M, Mertens T. The UL97 gene product of human cytomegalovirus is an early-late protein with a nuclear localization but is not a nucleoside kinase. *J Virol*. 1996;70(9):6340-6.
84. Steingruber M, Marschall M. The Cytomegalovirus Protein Kinase pUL97:Host Interactions, Regulatory Mechanisms and Antiviral Drug Targeting. *Microorganisms*. 2020;8(4):515.
85. Prichard MN, Gao N, Jairath S, Mulamba G, Krosky P, Coen DM, Parker BO, Pari GS. A recombinant human cytomegalovirus with a large deletion in UL97 has a severe replication deficiency. *J Virol*. 1999;73(7):5663-70.
86. Wolf DG, Courcelle CT, Prichard MN, Mocarski ES. Distinct and separate roles for herpesvirus-conserved UL97 kinase in cytomegalovirus DNA synthesis and encapsidation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(4):1895-900.
87. Göhring K, Hamprecht K, Jahn G. Antiviral Drug- and Multidrug Resistance in Cytomegalovirus Infected SCT Patients. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2015;13:153-9.
88. Prichard MN. Function of human cytomegalovirus UL97 kinase in viral infection and its inhibition by maribavir. *Rev Med Virol*. 2009;19(4):215-29.
89. Gilbert C, Boivin G. Human cytomegalovirus resistance to antiviral drugs. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(3):873-83.
90. Chou S. Advances in the genotypic diagnosis of cytomegalovirus antiviral drug resistance. *Antiviral Res*. 2020;176:104711.
91. Chou S, Van Wechel LC, Lichy HM, Marousek GI. Phenotyping of cytomegalovirus drug resistance mutations by using recombinant viruses incorporating a reporter gene. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(7):2710-5.
92. Smith IL, Cherrington JM, Jiles RE, Fuller MD, Freeman WR, Spector SA. High-level resistance of cytomegalovirus to ganciclovir is associated with alterations in both the UL97 and DNA polymerase genes. *J Infect Dis*. 1997;176(1):69-77.
93. Ijichi O, Michel D, Mertens T, Miyata K, Eizuru Y. GCV resistance due to the mutation A594P in the cytomegalovirus protein UL97 is partially reconstituted by a second mutation at D605E. *Antiviral Res*. 2002;53(2):135-42.
94. Razonable RR. Drug-resistant cytomegalovirus: clinical implications of specific mutations. *Curr Opin Organ Transplant*. 2018;23(4):388-94.

95. Sahoo MK, Lefterova MI, Yamamoto F, Waggoner JJ, Chou S, Holmes SP, Anderson MW, Pinsky BA. Detection of cytomegalovirus drug resistance mutations by next-generation sequencing. *J Clin Microbiol.* 2013;51(11):3700-10.
96. Chou S, Ercolani RJ, Sahoo MK, Lefterova MI, Strasfeld LM, Pinsky BA. Improved detection of emerging drug-resistant mutant cytomegalovirus subpopulations by deep sequencing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(8):4697-702.
97. Chevillotte M, Ersing I, Mertens T, von Einem J. Differentiation between polymorphisms and resistance-associated mutations in human cytomegalovirus DNA polymerase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(12):5004-11.
98. Chou S, Boivin G, Ives J, Elston R. Phenotypic evaluation of previously uncharacterized cytomegalovirus DNA polymerase sequence variants detected in a valganciclovir treatment trial. *J Infect Dis.* 2014;209(8):1219-26.
99. Kestler PDHA. MRA - Mutation Resistance Analyzer: Universität Ulm, AG Bioinformatics and Systems Biology, Institute of Neural Information Processing, Institute of Virology. Available from: [https://www.informatik.uni-ulm.de/ni/mitarbeiter/HKestler/mra/app/index.php?plugin=form./](https://www.informatik.uni-ulm.de/ni/mitarbeiter/HKestler/mra/app/index.php?plugin=form/) Last Accessed April 19, 2021
100. Chevillotte M, von Einem J, Meier BM, Lin FM, Kestler HA, Mertens T. A new tool linking human cytomegalovirus drug resistance mutations to resistance phenotypes. *Antiviral Res.* 2010;85(2):318-27.
101. Wilkinson GW, Davison AJ, Tomasec P, Fielding CA, Aicheler R, Murrell I, Seirafian S, Wang EC, Weekes M, Lehner PJ, Wilkie GS, Stanton RJ. eHuman cytomegalovirus: taking the strain. *Medical microbiology and immunology.* 2015;204(3):273-84.
102. Tischer BK, Kaufer BB. Viral bacterial artificial chromosomes: generation, mutagenesis, and removal of mini-F sequences. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:472537.
103. Borst E-M, Hahn G, Koszinowski UH, Messerle M. Cloning of the Human Cytomegalovirus (HCMV) Genome as an Infectious Bacterial Artificial Chromosome in *Escherichia coli*: a New Approach for Construction of HCMV Mutants. *Journal of Virology.* 1999;73(10):8320-9.
104. Chou S. Recombinant phenotyping of cytomegalovirus UL97 kinase sequence variants for ganciclovir resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(6):2371-8.

105. Landry ML, Stanat S, Biron K, Brambilla D, Britt W, Jokela J, Chou S, Drew WL, Erice A, Gilliam B, Lurain N, Manischewitz J, Miner R, Nokta M, Reichelderfer P, Spector S, Weinberg A, Yen-Lieberman B, Crumpacker C. A standardized plaque reduction assay for determination of drug susceptibilities of cytomegalovirus clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(3):688-92.
106. Flint SJ, Racaniello VR, Rall GF, Skalka AM, Enquist LW. *Principles of virology* 2015.
107. Lee GC, Lee DG, Choi SM, Yoo JH, Park SH, Choi JH, Min WS, Cho OH, Lee CH, Shin WS. Use of time-saving flow cytometry for rapid determination of resistance of human cytomegalovirus to ganciclovir. *J Clin Microbiol.* 2005;43(10):5003-8.
108. Prix L, Maierl J, Jahn G, Hamprecht K. A simplified assay for screening of drug resistance of cell-associated cytomegalovirus strains. *J Clin Virol.* 1998;11(1):29-37.
109. Gilbert C, Boivin G. New reporter cell line to evaluate the sequential emergence of multiple human cytomegalovirus mutations during in vitro drug exposure. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(12):4860-6.
110. Tischer BK, Smith GA, Osterrieder N. En passant mutagenesis: a two step markerless red recombination system. *Methods Mol Biol.* 2010;634:421-30.
111. Sinzger C, Hahn,G., Digel,M., Katona,R., Sampaio,K.L., Messerle,M., Hengel,H., Koszinowski,U., Brune,W. and Adler,B. Human herpesvirus 5 strain TB40/E clone TB40-BAC4, complete sequence. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/157779983/> Last Accessed April 20, 2021
112. Tischer BK, von Einem J, Kaufer B, Osterrieder N. Two-step red-mediated recombination for versatile high-efficiency markerless DNA manipulation in *Escherichia coli*. *Biotechniques.* 2006;40(2):191-7.
113. ThermoScientific GeneJET Gel Extraction Kit Protocol. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012661_GeneJET_Gel_Extraction_UG.pdf / Last accessed: April 21, 2021, 10:22 am
114. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Electroporation. *Cold Spring Harb Protoc.* 2019;2019(7).
115. Birnboim HC. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* 1983;100:243-55.
116. NucleoBond Xtra Plasmid Purification Protocol - Machery Nagel. <https://www.mn-net.com/media/pdf/ed/82/0f/Instruction-NucleoBond-Xtra.pdf> / Last accessed: April 21, 2021, 10:23 am

117. Thermo Scientific GeneJET PCR Purification Kit Protocol.
https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2Fassets%2Fmanuals%2FMAN0012662_GeneJET_PCR_Purification_UG.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogR2VuZUpFVCBQQ1lgUHVyaWZpY2F0aW9uIEdpdA== / Last accessed: April 21, 2021, 10:25 am
118. Amaxa™ Basic Nucleofector™ Kit for Primary Mammalian Fibroblasts Protocol.
https://bioscience.lonza.com/lonza_bs/DE/en/download/content/asset/21663/
Last accessed: April 21, 2021, 10:26 am
119. Lonsdale R, Pau MG, Oerlemans M, Ophorst C, Vooy A, Havenga M, Goudsmit J, UytdeHaag F, Marzio G. A rapid method for immunotitration of influenza viruses using flow cytometry. *J Virol Methods*. 2003;110(1):67-71.
120. Gueret V, Negrete-Virgen JA, Lyddiatt A, Al-Rubeai M. Rapid titration of adenoviral infectivity by flow cytometry in batch culture of infected HEK293 cells. *Cytotechnology*. 2002;38(1-3):87-97.
121. Li Z, Ling L, Liu X, Laus R, Delcayre A. A flow cytometry-based immuno-titration assay for rapid and accurate titer determination of modified vaccinia Ankara virus vectors. *J Virol Methods*. 2010;169(1):87-94.
122. Drayman N, Oppenheim A. Rapid titration of viruses by flow cytometry. *Curr Protoc Cell Biol*. 2011;Chapter 26:Unit 26 11.
123. Ibrahim SF, van den Engh G. Flow cytometry and cell sorting. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2007;106:19-39.
124. Chou S, Marousek GI, Van Wechel LC, Li S, Weinberg A. Growth and drug resistance phenotypes resulting from cytomegalovirus DNA polymerase region III mutations observed in clinical specimens. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(11):4160-2.
125. Martin M, Azzi A, Lin SX, Boivin G. Opposite effect of two cytomegalovirus DNA polymerase mutations on replicative capacity and polymerase activity. *Antivir Ther*. 2010;15(4):579-86.
126. Mocarski ES, Kemble GW, Lyle JM, Greaves RF. A deletion mutant in the human cytomegalovirus gene encoding IE1(491aa) is replication defective due to a failure in autoregulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(21):11321-6.
127. GraphPad Software, LLC. Equation: log(inhibitor) vs. response -- Variable slope.
https://www.graphpad.com/guides/prism/6/curve-fitting/reg_dr_inhibit_variable.htm / Accessed April 05, 2021.
128. Hamprecht K, Eckle T, Prix L, Faul C, Einsele H, Jahn G. Ganciclovir-resistant cytomegalovirus disease after allogeneic stem cell transplantation: pitfalls of phenotypic diagnosis by in vitro selection of an UL97 mutant strain. *J Infect Dis*. 2003;187(1):139-43.

129. Sinzger C, Hahn G, Digel M, Katona R, Sampaio KL, Messerle M, Hengel H, Koszinowski U, Brune W, Adler B. Cloning and sequencing of a highly productive, endotheliotropic virus strain derived from human cytomegalovirus TB40/E. *J Gen Virol.* 2008;89(Pt 2):359-68.
130. Fischer L, Sampaio KL, Jahn G, Hamprecht K, Gohring K. Identification of newly detected, drug-related HCMV UL97- and UL54-mutations using a modified plaque reduction assay. *J Clin Virol.* 2015;69:150-5.
131. Fischer L, Imrich E, Sampaio KL, Hofmann J, Jahn G, Hamprecht K, Gohring K. Identification of resistance-associated HCMV UL97- and UL54-mutations and a UL97-polymorphism with impact on phenotypic drug-resistance. *Antiviral Res.* 2016;131:1-8.
132. Chevillotte M, Schubert A, Mertens T, von Einem J. Fluorescence-based assay for phenotypic characterization of human cytomegalovirus polymerase mutations regarding drug susceptibility and viral replicative fitness. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(9):3752-61.
133. Chou S, Bowlin TL. Cytomegalovirus UL97 mutations affecting cyclopropavir and ganciclovir susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(1):382-4.
134. Chou S. Foscarnet resistance mutations mapping to atypical domains of the cytomegalovirus DNA polymerase gene. *Antiviral Res.* 2017;138:57-60.
135. Lurain NS, Spafford LE, Thompson KD. Mutation in the UL97 open reading frame of human cytomegalovirus strains resistant to ganciclovir. *J Virol.* 1994;68(7):4427-31.
136. Cihlar T, Fuller MD, Cherrington JM. Characterization of drug resistance-associated mutations in the human cytomegalovirus DNA polymerase gene by using recombinant mutant viruses generated from overlapping DNA fragments. *J Virol.* 1998;72(7):5927-36.
137. Baldick CJ, Marchini A, Patterson CE, Shenk T. Human cytomegalovirus tegument protein pp71 (ppUL82) enhances the infectivity of viral DNA and accelerates the infectious cycle. *J Virol.* 1997;71(6):4400-8.
138. Saffert RT, Kalejta RF. Inactivating a cellular intrinsic immune defense mediated by Daxx is the mechanism through which the human cytomegalovirus pp71 protein stimulates viral immediate-early gene expression. *J Virol.* 2006;80(8):3863-71.
139. Baldanti F, Underwood MR, Stanat SC, Biron KK, Chou S, Sarasini A, Silini E, Gerna G. Single amino acid changes in the DNA polymerase confer foscarnet resistance and slow-growth phenotype, while mutations in the UL97-encoded phosphotransferase confer ganciclovir resistance in three double-resistant human cytomegalovirus strains recovered from patients with AIDS. *J Virol.* 1996;70(3):1390-5.

140. Chou S, Lurain NS, Thompson KD, Miner RC, Drew WL. Viral DNA polymerase mutations associated with drug resistance in human cytomegalovirus. *J Infect Dis.* 2003;188(1):32-9.
141. Chou S. Phenotypic diversity of cytomegalovirus DNA polymerase gene variants observed after antiviral therapy. *J Clin Virol.* 2011;50(4):287-91.
142. Michel D, Schaarschmidt P, Wunderlich K, Heuschmid M, Simoncini L, Mühlberger D, Zimmermann A, Pavić I, Mertens T. Functional regions of the human cytomegalovirus protein pUL97 involved in nuclear localization and phosphorylation of ganciclovir and pUL97 itself. *J Gen Virol.* 1998;79 (Pt 9):2105-12.
143. Marschall M, Stein-Gerlach M, Freitag M, Kupfer R, van den Bogaard M, Stamminger T. Inhibitors of human cytomegalovirus replication drastically reduce the activity of the viral protein kinase pUL97. *J Gen Virol.* 2001;82(Pt 6):1439-50.
144. Chou S, Wechel LC, Marousek GI. Cytomegalovirus UL97 kinase mutations that confer maribavir resistance. *J Infect Dis.* 2007;196(1):91-4.
145. Springer KL, Chou S, Li S, Giller RH, Quinones R, Shira JE, Weinberg A. How evolution of mutations conferring drug resistance affects viral dynamics and clinical outcomes of cytomegalovirus-infected hematopoietic cell transplant recipients. *J Clin Microbiol.* 2005;43(1):208-13.
146. Schnepf N, Boiteau N, Petit F, Alain S, Sanson-Le Pors MJ, Mazon MC. Rapid determination of antiviral drug susceptibility of human cytomegalovirus by real-time PCR. *Antiviral Res.* 2009;81(1):64-7.
147. Kesson AM, Zeng F, Cunningham AL, Rawlinson WD. The use of flow cytometry to detect antiviral resistance in human cytomegalovirus. *J Virol Methods.* 1998;71(2):177-86.
148. McSharry JJ, Lurain NS, Drusano GL, Landay AL, Notka M, O'Gorman MR, Weinberg A, Shapiro HM, Reichelderfer PS, Crumpacker CS. Rapid ganciclovir susceptibility assay using flow cytometry for human cytomegalovirus clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42(9):2326-31.
149. McSharry JM, Lurain NS, Drusano GL, Landay A, Manischewitz J, Nokta M, O'Gorman M, Shapiro HM, Weinberg A, Reichelderfer P, Crumpacker C. Flow cytometric determination of ganciclovir susceptibilities of human cytomegalovirus clinical isolates. *J Clin Microbiol.* 1998;36(4):958-64.
150. GraphPad Software, LLC. Knowledge Base - Article #1356: 50% of what? How exactly are IC50 and EC50 defined?.2010.
<https://www.graphpad.com/support/faqid/1356/> Accessed April 19, 2021.
151. Sebaugh JL. Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharm Stat.* 2011;10(2):128-34.

152. Chou S, Van Wechel LC, Marousek GI. Effect of cell culture conditions on the anticytomegalovirus activity of maribavir. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(7):2557-9.
153. Chou S, Ercolani RJ, Vanarsdall AL. Differentiated Levels of Ganciclovir Resistance Conferred by Mutations at Codons 591 to 603 of the Cytomegalovirus UL97 Kinase Gene. *J Clin Microbiol.* 2017;55(7):2098-104.
154. Coggins SA, Mahboubi B, Schinazi RF, Kim B. SAMHD1 Functions and Human Diseases. *Viruses.* 2020;12(4).
155. Franzolin E, Pontarin G, Rampazzo C, Miazzi C, Ferraro P, Palumbo E, Reichard P, Bianchi V. The deoxynucleotide triphosphohydrolase SAMHD1 is a major regulator of DNA precursor pools in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(35):14272-7.
156. Tramentozzi E, Ferraro P, Hossain M, Stillman B, Bianchi V, Pontarin G. The dNTP triphosphohydrolase activity of SAMHD1 persists during S-phase when the enzyme is phosphorylated at T592. *Cell Cycle.* 2018;17(9):1102-14.
157. Ordonez P, Kunzelmann S, Groom HC, Yap MW, Weising S, Meier C, Bishop KN, Taylor IA, Stoye JP. SAMHD1 enhances nucleoside-analogue efficacy against HIV-1 in myeloid cells. *Sci Rep.* 2017;7:42824.
158. Huber AD, Michailidis E, Schultz ML, Ong YT, Bloch N, Puray-Chavez MN, Leslie MD, Ji J, Lucas AD, Kirby KA, Landau NR, Sarafianos SG. SAMHD1 has differential impact on the efficacies of HIV nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(8):4915-9.
159. Biron KK, Stanat SC, Sorrell JB, Fyfe JA, Keller PM, Lambe CU, Nelson DJ. Metabolic activation of the nucleoside analog 9-[(2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy)methyl]guanine in human diploid fibroblasts infected with human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82(8):2473-7.
160. Gentry BG, Drach JC. Metabolism of cyclopropavir and ganciclovir in human cytomegalovirus-infected cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(4):2329-33.
161. Gentry BG, Im M, Boucher PD, Ruch RJ, Shewach DS. GCV phosphates are transferred between HeLa cells despite lack of bystander cytotoxicity. *Gene Ther.* 2005;12(13):1033-41.
162. Eckle T, Prix L, Jahn G, Klingebiel T, Handgretinger R, Selle B, Hamprecht K. Drug-resistant human cytomegalovirus infection in children after allogeneic stem cell transplantation may have different clinical outcomes. *Blood.* 2000;96(9):3286-9.

163. Baldanti F, Simoncini L, Sarasini A, Zavattoni M, Grossi P, Revello MG, Gerna G. Ganciclovir resistance as a result of oral ganciclovir in a heart transplant recipient with multiple human cytomegalovirus strains in blood. *Transplantation*. 1998;66(3):324-9.
164. Chou S, Guentzel S, Michels KR, Miner RC, Drew WL. Frequency of UL97 phosphotransferase mutations related to ganciclovir resistance in clinical cytomegalovirus isolates. *J Infect Dis*. 1995;172(1):239-42.
165. Abraham B, Lastere S, Reynes J, Bibollet-Ruche F, Vidal N, Segondy M. Ganciclovir resistance and UL97 gene mutations in cytomegalovirus blood isolates from patients with AIDS treated with ganciclovir. *J Clin Virol*. 1999;13(3):141-8.
166. Chou S, Waldemer RH, Senters AE, Michels KS, Kemble GW, Miner RC, Drew WL. Cytomegalovirus UL97 phosphotransferase mutations that affect susceptibility to ganciclovir. *J Infect Dis*. 2002;185(2):162-9.
167. Michel D, Höhn S, Haller T, Jun D, Mertens T. Aciclovir selects for ganciclovir-cross-resistance of human cytomegalovirus in vitro that is only in part explained by known mutations in the UL97 protein. *J Med Virol*. 2001;65(1):70-6.
168. Hantz S, Michel D, Fillet AM, Guignon V, Champier G, Mazon MC, Bensman A, Denis F, Mertens T, Dehee A, Alain S. Early selection of a new UL97 mutant with a severe defect of ganciclovir phosphorylation after valaciclovir prophylaxis and short-term ganciclovir therapy in a renal transplant recipient. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(4):1580-3.
169. Gilbert C, Azzi A, Goyette N, Lin SX, Boivin G. Recombinant phenotyping of cytomegalovirus UL54 mutations that emerged during cell passages in the presence of either ganciclovir or foscarnet. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(9):4019-27.
170. Chou S. Comparison of Cytomegalovirus Terminase Gene Mutations Selected after Exposure to Three Distinct Inhibitor Compounds. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(11).

6 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Amelie Luisa Schneider, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Phänotypisierung unbeschriebener Mutationen im UL54-Gen eines multiresistenten klinischen HCMV-Isolats“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

7 Tabellarischer Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

8 Publikationsliste

Vortrag mit Auszeichnung:

20th “State-of-the-Art” Educational Course of the Infectious Diseases Working Party
(12.-14. Oktober 2017):

„Emergence of a multi-drug resistant Cytomegalovirus isolate after stem cell transplantation with novel potential resistance-associated mutations”

Amelie Schneider, Klaus Hamprecht, Jörg Hofmann, Lüder Wiebusch, Sebastian Voigt

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zuerst danke ich PD Dr. med. Sebastian Voigt und Dr. rer. nat Lüder Wiebusch für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, im Labor für pädiatrische Molekularbiologie zu arbeiten. Außerdem bedanke ich mich für ihre wissenschaftliche Betreuung während der laborpraktischen Arbeiten sowie für das Korrekturlesen der Arbeit.

Iris Gruska und Dr. Barbara Vetter danke ich für die ausführliche Einführung in die praktische Laborarbeit und ihr stets offenes Ohr für jegliche Fragen sowie für eine freundliche und angenehme Arbeitsatmosphäre mit lustigen Momenten im Labor.

Außerdem bedanke ich mich bei Apl. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat Klaus Hamprecht, den Mitgliedern des Konsiliarlabors in Tübingen und insbesondere bei Trinh Weitbrecht für die Durchführung des Plaque-Reduktions-Assays.

Ferner danke ich dem Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin, die mich bei statistischen Fragen beraten haben.

Der Studienstiftung des deutschen Volkes bin ich sehr dankbar für die Förderung während meines gesamten Studiums und die zusätzliche Unterstützung eines Freisemesters für die praktische Arbeit im Labor.

Ein besonderer Dank gilt Quang Vinh Phan, der mich bei der Fertigstellung dieser Arbeit mit konstruktiver Kritik, Software-Unterstützung und motivierenden Worten fortwährend unterstützt hat.

Abschließend bedanke ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für die emotionale Unterstützung, den positiven Zuspruch und die anhaltende Geduld während der Erstellung dieser Arbeit sowie in allen Lebenslagen.