

Aus dem Robert Koch Institut & der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt  
Onkologie und Hämatologie der Medizinischen Fakultät Charité –  
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Evaluierung moderner Sequenziermethoden in der frühzeitigen Diagnostik  
therapieresistenter Mutanten des humanen Zytomegalievirus

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jenny Mitteldorf, geb. Schröder

aus Berlin

Datum der Promotion: 09.09.2016

# Inhaltsverzeichnis

1	Abstrakt .....	1
2	Einleitung .....	3
2.1	Das humane Zytomegalievirus (HCMV) .....	3
2.1.1	Genomstruktur und Morphologie .....	3
2.1.2	Epidemiologie und Übertragung .....	4
2.2	Die HCMV-Infektion .....	4
2.2.1	HCMV bei immunkompetenten Individuen .....	5
2.2.2	HCMV bei immunsupprimierten Patienten .....	5
2.3	Prävention, Diagnostik und antivirale Therapie .....	6
2.3.1	Prävention .....	6
2.3.2	Diagnostik .....	6
2.3.3	Antivirale Therapie .....	7
2.4	Virostatika-resistente Zytomegalieviren .....	9
2.4.1	Vorkommen und Bedeutung .....	9
2.4.2	Resistenztestung .....	10
2.4.2.1	Phänotypische Resistenztestung .....	10
2.4.2.2	Genotypische Resistenztestung .....	11
2.4.3	Next Generation Sequencing (Hochdurchsatz-Sequenzierung) .....	12
2.4.4	Molekulargenetischer Hintergrund .....	12
2.5	Genprodukt pUL97 .....	12
2.5.1	pUL97: Ganciclovir-Resistenz-bedingende Mutationen .....	13
2.6	Genprodukt pUL54 .....	16
2.6.1	pUL54: Ganciclovir-Resistenz-bedingende Mutationen .....	16
2.7	Aufgabenstellung .....	19
3	Material und Methoden .....	21
3.1	Material .....	21
3.1.1	Probenmaterial .....	21
3.1.2	Bakterienstämme .....	23
3.1.3	Primer und Sonden .....	23
3.1.4	Chemikalien .....	27
3.1.5	Puffer und Lösungen .....	28
3.1.6	Enzyme, DNA-Marker und Vektoren .....	28
3.1.7	Reagenziensets (Kits) .....	29

3.1.8	Software.....	29
3.1.9	Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	30
3.2	Methoden.....	31
3.2.1	DNA-Extraktion .....	31
3.2.2	Polymerasekettenreaktion.....	31
3.2.3	Long-Distance PCR.....	33
3.2.4	Agarose-Gelelektrophorese .....	35
3.2.5	Aufreinigung von PCR-Produkten .....	35
3.2.6	Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung .....	36
3.2.7	Kopienzahlberechnung .....	36
3.2.8	DNA-Sequenzierung mittels Didesoxymethode nach Sanger.....	36
3.2.9	Pyrosequenzierung .....	38
3.2.9.1	Prinzip .....	38
3.2.9.2	Durchführung .....	39
3.2.10	Next Generation Sequencing (NGS) .....	40
3.2.11	Klonierung mit TOPO-TA .....	42
3.2.11.1	Herstellung rekombinanter Plasmide.....	42
3.2.11.2	Isolierung von Plasmid-DNA (Miniprep).....	43
3.2.11.3	Restriktionsverdau.....	44
4	Ergebnisse .....	46
4.1	Versuchsablauf .....	46
4.2	Kopienzahlbestimmung mittels Real-time PCR.....	46
4.3	Pyrosequenzierung UL97 .....	49
4.3.1	PSQ mit Assay 1.....	50
4.3.2	PSQ mit Assay 2.....	52
4.3.3	PSQ mit Assay 3.....	52
4.3.4	Pyrosequenzierung der Patientenproben .....	53
4.3.4.1	Patient 1 .....	54
4.3.4.2	Patient 2.....	54
4.3.4.3	Patient 3.....	55
4.3.4.4	Patient 4.....	56
4.3.4.5	Patient 5.....	57
4.3.4.6	Patient 6.....	58
4.3.4.7	Patient 7.....	59

4.3.4.8	Patient 8.....	60
4.3.4.9	Patient 9.....	61
4.3.4.10	Patient 10.....	62
4.3.4.11	Patient 11.....	62
4.3.4.12	Patient 12.....	63
4.3.4.13	Patient 13.....	64
4.4	Vergleich der Pyrosequenzen mit den Ergebnissen der Sanger-Sequenzierung.....	65
4.4.1	Ergebnisvergleich mit Sanger bei mittels PSQ nachgewiesener UL97-Mutation.....	65
4.4.1.1	Patient 3.....	65
4.4.1.2	Patient 7.....	67
4.4.1.3	Patient 10.....	68
4.5	Vergleich der Pyrosequenzierung mit den Ergebnissen der Klonierung.....	69
4.6	Mutationssuche im ORF UL54 mittels PCR und Sanger-Sequenzierung.....	71
4.7	Probenanalyse mittels Next Generation Sequencing (NGS).....	72
4.7.1	NGS von Patientenproben.....	73
4.8	Vergleich der NGS-Ergebnisse mit denen aus PSQ und Sanger.....	75
5	Diskussion.....	77
5.1	Genotypische Verfahren zur Detektion Resistenz-assoziiertes Mutationen im ORF UL 97.....	78
5.2	Einfluss der Genomkopienzahl im Ansatz auf die Ergebnisse der PSQ.....	80
5.3	Korrelation der PSQ-Ergebnisse mit klinischen Verlaufsdaten.....	81
5.3.1	Patientenmaterial ohne relevanten Nachweis Resistenz-assoziiertes Mutationen.....	82
5.3.2	Patientenmaterial mit vereinzelt Mutationenachweis.....	82
5.3.3	Patientenmaterial mit signifikantem Mutationenachweis.....	84
5.4	Vergleich der PSQ-Ergebnisse der Patientenproben mit Ergebnissen aus der Literatur.....	85
5.5	Ergebnisvergleich mit Sanger.....	86
5.5.1	Patient 3.....	87
5.5.1.1	Ergebnisabweichung in Codon 595 zwischen Sanger und PSQ.....	87
5.5.2	Patient 7.....	89
5.5.3	Patient 10.....	90
5.6	Ergebnisvergleich der PSQ-Ergebnisse mit denen der Klonierung.....	91
5.7	Ergebnisvergleich von Sanger und PSQ mit denen des NGS.....	91
5.8	Mutationssuche im ORF UL54.....	93
5.9	Ausblick.....	94
5.9.1	Diagnostische Verfahren zum Mutationenachweis.....	94

5.9.2	Therapeutische Optionen.....	95
6	Literaturverzeichnis.....	96
7	Abkürzungsverzeichnis .....	103
8	Eidesstattliche Versicherung .....	106
9	Lebenslauf .....	107

## 1 Abstrakt

Eine Infektion mit dem zur Familie der Herpesviren gehörenden humanen Zytomegalievirus (HCMV) nimmt bei Immunkompetenten i.d.R. einen asymptomatischen Verlauf. Gefährdet, sowohl durch eine Erstinfektion, als auch durch die endogene Reaktivierung des latent im Körper verweilenden Erregers, sind jedoch Patienten nach Organtransplantation, AIDS-Patienten sowie Un- und Frühgeborene. Klinisch können gravierende Organbeteiligungen und nicht selten fatale Krankheitsverläufe resultieren. Goldstandard zur therapeutischen Intervention ist das Nukleosidanalogon Ganciclovir, dessen Einsatz in den letzten Jahren vermehrt zum Auftreten phänotypisch resistenter HCMV-Stämme führte. Als genotypisches Korrelat der Resistenzentwicklung konnten Mutationen in den *open reading frames* (ORFs) UL97 und UL54 des Virusgenoms verantwortlich gemacht werden. Um diese frühestmöglich zu detektieren und eine Therapieumstellung zu ermöglichen, existieren genotypische Nachweisverfahren, die sich insbesondere in ihrer Sensitivität hinsichtlich der Erkennung geringer Mutantenanteile in mischinfiziertem Patientenmaterial unterscheiden. Ziel dieser Arbeit war es, dahingehend verschiedene moderne Sequenzierungsmethoden mit der derzeit im klinischen Alltag etablierten Sanger-Sequenzierung zu vergleichen. Dabei erfolgte zunächst die Analyse des ORFs UL97 in klinischen Patientenproben mit dem Verfahren der Pyrosequenzierung sowie der Vergleich der ermittelten Sequenzen mit den Ergebnissen der Methode nach Sanger, wobei die Pyrosequenzierung als sensitiveres der beiden Verfahren bestätigt werden konnte. Anschließend erfolgte die Untersuchung ausgewählter Proben mit Hilfe der Amplicon-Sequenzierung. Wurde in einer Probe mehr als eine Mutation detektiert, so konnte mit Hilfe der Klonierung zwischen dem gleichzeitigen Auftreten einzeln mutierter Virusstämme und dem Vorliegen von Doppelmutanten unterschieden werden. Patientenproben mit hoher Viruslast wurden zudem mit Hilfe der Sanger-Sequenzierung auf das Vorhandensein Resistenz-assoziiierter Mutationen im ORF UL54 untersucht. Eine derartige Mutation konnte jedoch im vorhandenen Patientenmaterial nicht nachgewiesen werden.

Zusammenfassend betrachtet stellt die Methode der Pyrosequenzierung derzeit das bevorzugte Verfahren dar, da sie bei überschaubarem Zeit- und Kostenaufwand einen gezielten Nachweis Resistenz-assoziiierter Mutationen ermöglicht und insbesondere hinsichtlich der Detektion minoritärer Mutantenanteile in Virusmischpopulation der Sanger-Sequenzierung überlegen ist. Vielversprechend sind insbesondere hinsichtlich ihrer hohen Durchsatzrate auch neuere Verfahren des Next Generation Sequencing, wobei hier neben einer Kostenoptimierung weitere Studien zur Evaluation von Sensitivität und Sicherheit der Methode abzuwarten sind.

## **Abstract**

In immunocompetent individuals, infections with human cytomegalovirus, which belongs to the herpesvirus family, usually causes mild or no symptoms. In contrary, primary infection or reactivation of the latent infection that the virus establishes for the lifetime of its host endangers immunocompromised individuals such as transplant recipients or HIV patients and unborn children. For those the infection can lead to severe morbidity which might be fatal. The nucleoside analog Ganciclovir is currently the therapeutic gold standard for treating HCMV. Its increased use led to the appearance of phenotypic resistant virus over the last few decades. Genotypic methods identified the origin of those resistances in mutations in the ORFs UL97 and UL54 of the virus genome. Multiple methods for sensitive and early detection of resistance-associated mutations exist that differ especially in their ability in detecting minor amounts of resistant viruses in a mixed population. The goal of this work was to evaluate different modern sequencing methods and compare their abilities in early detection of relevant mutations with Sanger sequencing, which is used in clinical standard diagnostics. First, analysis of HCMV ORF UL97 in clinical samples using pyrosequencing assays was compared with the results of Sanger sequencing, which confirmed pyrosequencing a higher sensitivity. Afterwards selected samples were additionally analyzed by next generation sequencing. If more than one mutation was detected in one sample a cloning approach was used to differentiate between two independent virus strains with each carrying one of the mutations and the appearance of a twofold mutated strain.

Furthermore clinical samples with high viral loads where tested for the existence of resistance-associated mutations in ORF UL54. The latter could not be detected in the material analyzed.

All in all pyrosequencing currently seems to be the most recommendable sequencing approach in detecting HCMV UL97 mutations. Its costs and expenditure of time are manageable and it outmatches classic Sanger sequencing in verification of minor mutated strains in mixed virus populations. Especially regarding its high throughput next generation sequencing is promising as well. Presently an improvement of costs and an evaluation of its sensitivity are needed to define its role in routine diagnostics.

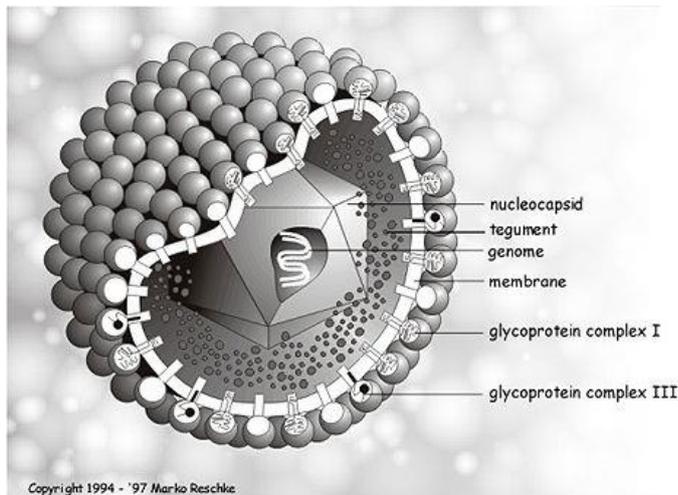
## 2 Einleitung

### 2.1 Das humane Zytomegalievirus (HCMV)

Das humane Zytomegalievirus (HCMV) gehört zu den *Herpesviridae*, die neben Säugetieren auch Vögel und Reptilien infizieren. Bisher wurden acht humanpathogene Spezies identifiziert. Dabei gehört das Zytomegalievirus zur Subfamilie der *Betaherpesvirinae* und ist auch als humanes Herpesvirus 5 (HHV 5) bekannt. Gemeinsam ist den Herpesviren die charakteristische Fähigkeit, nach der Primärinfektion im Organismus zu persistieren. Da *Herpesviridae* eine sehr enge Koevolution mit ihren Wirten durchliefen, sind Wirt und Virus so gut aneinander angepasst, dass die Infektion mit einem Herpesvirus meist zu keinen oder nur sehr schwach ausgeprägten und unspezifischen Symptomen führt (McGeoch 1995). Verschiedene Einflussfaktoren, wie zelluläre Stressreaktionen oder Immunsuppression, können jedoch zur Reaktivierung der Virusreplikation führen, die neben der Zytolyse mit dem Auftreten von Krankheitssymptomen einhergehen kann.

#### 2.1.1 Genomstruktur und Morphologie

Mit einer Genomgröße von 235 kbp und einer Kodierungskapazität für über 200 Genprodukte ist das humane Zytomegalievirus das größte der acht aktuell bekannten humanpathogenen Herpesviren. Der Durchmesser eines Virions beträgt 200-300 nm. Mindestens 20 verschiedene virale Glykoproteine sind in die Hüllmembran eingelagert, woraus sich eine dezent irreguläre Form ergibt. Eingebettet in das virale Tegument liegt das ikosaedrisch geformte Kapsid, welches fünf mit dem Genom assoziierte Core-Proteine enthält. Zudem sind in die tegumentale Matrixschicht mindestens 27 unterschiedliche Proteine integriert, sowie zelluläre und virale RNA. Diese wirkt sowohl über ihre direkte Bindung an Tegumentproteine, als auch durch ihre negative Ladung einem Proteinabbau entgegen (Mocarski Jr u. Shenk 2007). Abbildung 2.1. zeigt den schematischen Aufbau eines Herpesvirions.



**Abb. 2.1 schematische Darstellung eines Herpesvirions**

Quelle: *Book of Viruses*, <http://virology.net>

### 2.1.2 Epidemiologie und Übertragung

Das humane Zytomegalievirus weist beim Menschen eine unterschiedliche Durchseuchungsrate auf. Diese schwankt zwischen 50-60 % in Industrienationen bis zur nahezu vollständigen Durchseuchung in Entwicklungsländern, wobei der Großteil der Daten auf Untersuchungen unter schwangeren Frauen basiert (Mocarski Jr u. Shenk 2007, Shaiegan 2015, Vibilic-Cavlek 2015, Shigemi 2015). Ursächlich für die interkulturellen Schwankungen sind unter anderem Unterschiede im sozioökonomischen Status und kulturelle Besonderheiten wie Gepflogenheiten bei der Säuglingsernährung.

Übertragen wird das Virus hauptsächlich oropharyngeal. Infektionsquellen sind neben Muttermilch und Speichel vor allem auch Blut und Blutprodukte, Urin und Genitalsekret. Insbesondere die diaplazentare Übertragung durch die Mutter auf das Kind ist zudem von Bedeutung, da es neben einer Primärinfektion während der Schwangerschaft durch hormonelle Schwankungen auch zur Reaktivierung einer früheren HCMV-Infektion der Mutter kommen kann.

## 2.2 Die HCMV-Infektion

Nach der primären Infektion wurde die Persistenz des Virus in wirtseigenen CD34<sup>+</sup> myeloischen Vorläuferzellen des Knochenmarks, in CD14<sup>+</sup> Monozyten, in dendritischen Zellen, sowie in Megakaryozyten nachgewiesen (Taylor-Wiedeman et al. 1991, Mendelson et al. 1996, Crapnell et al. 2000), wobei eine Virämie insbesondere durch zellvermittelte Immunvorgänge verhindert

wird (Biron 2006). Kommt es im Folgenden zu einer Beeinträchtigung des Immunstatus, kann dies zu einer Reaktivierung des Virus aus der Latenz führen. Im Allgemeinen verläuft diese zwar ebenso subklinisch wie die Primärinfektion, geht allerdings mit einer Virusausscheidung und somit potentieller Infektiösität einher.

### **2.2.1 HCMV bei immunkompetenten Individuen**

Bei immunkompetenten Menschen verläuft eine Primärinfektion mit HCMV meist asymptomatisch. In Ausnahmefällen können Mononukleose-ähnliche Symptome, wie Lymphadenopathie und Fieber auftreten. Die Inkubationszeit liegt dabei zwischen vier und acht Wochen.

([http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_Zytomegalievirus.html](http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Zytomegalievirus.html))

### **2.2.2 HCMV bei immunsupprimierten Patienten**

Gravierender verlaufen Infektionen mit HCMV hingegen bei Immunsuppression, wie sie beispielsweise bei HIV-Infizierten oder auch iatrogen im Rahmen einer Chemotherapie oder Transplantation (TX) auftritt. Zudem kann eine HCMV-Infektion beim unreifen Immunsystem eines Neugeborenen zu gravierenden Symptomen führen. So spielt die vertikale Übertragung des Virus durch die Mutter auf das Kind, insbesondere bei einer Primärinfektion der Mutter während der Schwangerschaft, eine entscheidende Rolle. Aber auch die sekundäre Reaktivierung des Virus aufgrund hormoneller Umstellungen während der Schwangerschaft kann für das Ungeborene unerwünschte Konsequenzen haben (Mocarski Jr u. Shenk 2007).

Weltweit kommt es unabhängig vom Serostatus der betrachteten Population bei etwa 1% aller Lebendgeburten zu kongenitalen Infektionen mit dem humanen Zytomegalievirus (Mocarski Jr u. Shenk 2007). Während etwa 90% dieser Infektionen asymptomatisch verlaufen, entwickeln etwa 5-10% der betroffenen Kinder klinische Symptome (Biron 2006). Am häufigsten beschrieben sind hierbei Petechien, Ikterus und Hepatosplenomegalie, sowie neurologische Auffälligkeiten wie Mikrozephalie, intrakranielle Kalkablagerungen und erweiterte Ventrikelräume. Insbesondere aus den Manifestationen am ZNS ergeben sich oftmals Langzeitschäden, wie mentale Retardierung, Hörschäden oder Störungen der Wahrnehmung und Psychomotorik. Zudem wurden auch bei einem Teil der zunächst asymptomatischen Kinder im späteren Verlauf sensineurale Hörschäden festgestellt (Ross u. Boppana 2005).

Für Patienten nach Organ- oder Stammzelltransplantation steigt durch eine Infektion mit HCMV trotz verbesserter Behandlungs- und Überwachungsoptionen nicht nur die Morbidität und

Mortalität, sie stellt zudem einen der Hauptrisikofaktoren für eine Abstoßungsreaktion des Körpers gegen das transplantierte Gewebe dar. Besonders hoch ist das Risiko dann, wenn ein seronegativer Empfänger Organe eines seropositiven Donors erhält (Gandhi u. Khanna 2004, Biron 2006, Nichols 2002). Aber auch für seropositive Empfänger steigt mit der immunsuppressiven Behandlung nach der Transplantation das Risiko der Reaktivierung.

Dabei spielen sowohl direkt durch das Virus verursachte Schäden an den verschiedenen Organsystemen eine Rolle, als auch indirekte Nebeneffekte durch zahlreiche Interaktionen mit dem Immunsystem des Wirts, die insbesondere den Weg für bakterielle Sekundär- und Pilzinfektionen ebnen können (Nichols 2002). So nimmt das Virus u.a. Einfluss auf die Expression von HLA-Merkmalen, die Produktion bestimmter Zytokine sowie auf die Expression von Adhärenzmolekülen (Nichols 2002). Durch eine Knochenmarkbeteiligung fällt zudem die Zahl der roten und weißen Blutkörperchen ab, wodurch das Immunsystem weiter geschwächt wird.

## **2.3 Prävention, Diagnostik und antivirale Therapie**

### **2.3.1 Prävention**

Grundsätzlich sollten vor einer geplanten Transplantation sowohl Spender als auch Empfänger auf das Vorhandensein einer HCMV-Infektion getestet werden. Ist der Empfänger dabei als seronegativ getestet worden, sollte wenn möglich der Spender ebenfalls seronegativ sein. Darüber hinaus muss bei Stammzelltransplantationen darauf geachtet werden, dem Patienten nur Leukozyten-depletierte sowie bestrahlte Blutprodukte zu transfundieren. Der Einsatz von Immunglobulinen zur Primärprävention einer HCMV-Infektion wird nicht mehr empfohlen. Patienten, die in sogenannter Hochrisikokonstellation (D+/R-) transplantiert wurden, sollten engmaschig kontrolliert werden. Im Anschluss an die Transplantation eines Organs wird unter Umständen direkt mit der prophylaktischen Gabe von Ganciclovir (GCV) begonnen. Dieses Prozedere ist nach Stammzelltransplantationen nicht üblich. Hier wird bei PCR-Nachweis von Virus-DNA im Patientenblut eine Präemptivtherapie begonnen.

### **2.3.2 Diagnostik**

Durch die European Conference of Infections in Leukaemia (ECIL) wurden diagnostische Standards zum Nachweis einer HCMV-Infektion sowie HCMV-assoziiierter Organerkrankungen festgelegt. Dabei sollte der Nachweis einer Infektion mit dem humanen Zytomegalievirus stets im peripheren Blut des Patienten erfolgen. Hierzu stehen neben Immunoassays zur Detektion

CMV-spezifischer Antigene quantitative Nachweisverfahren zur Detektion viraler DNA oder auch RNA zur Verfügung. Zur Diagnosestellung einer HCMV-Erkrankung ist dies jedoch nicht ausreichend. Diese gilt erst als bewiesen, wenn neben CMV-typischen klinischen Symptomen die Infektion im betroffenen Gewebe/Organ nachgewiesen werden kann. Der alleinige Nachweis einer Virämie reicht hierbei auch in Zusammenschau mit klinischen Symptomen nicht aus. Auch der PCR-Nachweis im betroffenen Gewebe gilt aufgrund des niedrigen positiven prädiktiven Wertes der PCR nicht als beweisend (ECIL Guidelines update 2011, [http://www.eortc.org/wp-content/uploads/2015/07/ECIL-4\\_2011-Update-2011-CMV.pdf](http://www.eortc.org/wp-content/uploads/2015/07/ECIL-4_2011-Update-2011-CMV.pdf)). Ist eine Infektion oder gar Erkrankung bewiesen, muss unverzüglich mit der Therapie begonnen werden. Bleibt nach etwa 14-tägiger antiviraler Therapie die Viruslast hoch oder steigt gar an, muss eine Resistenzentwicklung in Betracht gezogen werden und entsprechende weiterführende Diagnostik erfolgen.

### **2.3.3 Antivirale Therapie**

In der Therapie von Zytomegalievirus-Infektionen bei immunsupprimierten Patienten finden derzeit drei verschiedene Behandlungskonzepte Anwendung. Die konventionelle symptomorientierte Therapie beginnt mit dem Auftreten erster klinischer Zeichen einer Infektion oder Reaktivierung. Mit der weitverbreiteten Nutzung prophylaktischer und präemptiver Behandlungsstrategien konnten darüber hinaus in den letzten Jahrzehnten sowohl Morbidität als auch Mortalität insbesondere bei Transplantationspatienten signifikant gesenkt werden (Humar u. Snyderham 2009, Torres-Madriz 2008). Die prophylaktische Gabe der Virostatika findet in erster Linie nach Organtransplantation Anwendung. Sie beginnt dabei mit dem Zeitpunkt der Transplantation und wird anschließend in der Regel über 90-100 Tage fortgeführt. Mit dem prophylaktischen Therapiekonzept wird in Kauf genommen, dass gegebenenfalls mehr Patienten therapiert und somit auch unerwünschten Arzneimittelwirkungen ausgesetzt werden, als unbedingt nötig (Lurain u. Chou 2010). Um diesen Patientenanteil zu minimieren, kann auf die Präemptivtherapie zurückgegriffen werden. Der Beginn der Behandlung erfolgt dabei mit dem ersten Nachweis kleinster Viruskonzentrationen im Blut, während der Patient noch frei von Symptomen ist.

Zur virostatischen Therapie stehen aktuell verschiedene Medikamente zur Verfügung. Als Standard in der Prophylaxe und Therapie von HCMV-bedingten Erkrankungen gilt seit 1989 das Nukleosidanalogon Ganciclovir [9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl-)guanin] (Boivin et al. 2005). Angriffspunkt ist dabei die virale DNA-Polymerase. Um wirksam zu werden, muss GCV

jedoch initial phosphoryliert werden. Dies geschieht in zwei Schritten, zum einen durch die virale UL97 Proteinkinase, die GCV in GCV-Monophosphat überführt und zum anderen durch zelluläre Kinasen, die anschließend die Umsetzung zu aktivem GCV-Triphosphat vermitteln. Kommt es nun während der viralen DNA-Synthese zum Einbau des Guanosinanalogs, führt dieses, durch das Fehlen des Riboserestes, zum Kettenabbruch. Das Virus wird somit an seiner Replikation gehindert. GCV und sein Prodrug Valganciclovir, welches aufgrund seiner besseren Bioverfügbarkeit oral appliziert werden kann, finden aufgrund ihrer guten Wirksamkeit in allen drei o.g. Behandlungskonzepten Anwendung. Als häufige Nebenwirkungen spielen neben gastrointestinalen Beschwerden und neurologischen Symptomen, wie Kopfschmerz und Schwindel, vor allem der myelosuppressive Effekt des Virostatikums eine entscheidende Rolle. Schwere Neutropenien und der damit einhergehende Anstieg der Infektanfälligkeit erzwingen nicht selten den Abbruch der Therapie mit GCV.

1991 wurde das Pyrophosphat-Analogon Foscarnet (FOS) für die Therapie der CMV-Retinitis bei AIDS Patienten zugelassen. Aufgrund seiner Nebenwirkungen gilt es als Virostatikum der zweiten Wahl, kann allerdings bei Therapieversagen oder Neutro- und Leukopenien durch GCV als Alternative herangezogen werden (Biron 2006). Auch FOS inhibiert die virale DNA-Polymerase, benötigt aber keine aktivierende Modifikation. Nach Bindung an die Pyrophosphatbindungsstelle verhindert es am Ende des entstehenden DNA-Strangs die Abspaltung der Phosphatgruppe vom letzten Triphosphat und stoppt somit die Elongation. Da Foscarnet nephrotoxisch ist, kann es unter der Therapie durch eine eingeschränkte Nierenfunktion zu gravierenden Elektrolytverschiebungen kommen, die u.U. zu lebensbedrohlichen Herzrhythmusstörungen und Krampfanfällen führen können (Biron 2006).

Als weiteres Virostatikum findet Cidofovir (CDV) in der CMV-Therapie Anwendung. Dieses azyklische Nukleosid-Phosphonat inhibiert ebenfalls die virale DNA-Synthese. Nach Aufnahme in die Zelle wird CDV von den dortigen Kinasen in die diphosphorylierte aktive Form überführt und bindet als kompetitiver Inhibitor an die DNA-Polymerase. Es kommt zum vorzeitigen Kettenabbruch. Aufgrund seiner geringen oralen Bioverfügbarkeit kann CDV nur intravenös verabreicht werden. Da die Anwendung zudem häufig mit Nebenwirkungen verbunden ist, gilt auch CDV als Therapeutikum zweiter Wahl. Insbesondere aufgrund der starken Nephrotoxizität muss therapiebegleitend protektiv Probenecid verabreicht werden. Hinzu kommen Neutropenien, sowie das kanzerogene und auch teratogene Potenzial des Virostatikums (Ortiz et al. 2005, Biron 2006).

Als vielversprechendes neues Medikament galt Maribavir, ein Benzimidazol Ribosid, welches nicht wie die o.g. Substanzen an der viralen DNA-Polymerase angreift, sondern die virale UL97 Proteinkinase inhibiert. Ferner verfügt es über eine gute orale Bioverfügbarkeit sowie eine vergleichsweise geringe zytotoxische Aktivität (Alain 2013). In Phase III-Studien konnte jedoch keine Überlegenheit gegenüber einem Placebo nachgewiesen werden (Marty et al. 2011).

Alternativ wird derzeit das neuartige Virostatikum Letermovir (AIC246) in Phase-III-Studien getestet. Anders als bisherige Therapeutika greift Letermovir wesentlich später in die Virusreplikation ein, genauer an der Untereinheit pUL56 des viralen Terminase-Komplexes. Hier verhindert der Wirkstoff eine Spaltung der viralen DNA (Konkatemere) in Einzelfragmente sowie deren anschließende Verteilung auf die vorgefertigten Kapside. In einer zwischen März 2010 und Oktober 2011 durchgeführten Phase-II-Studie kam es unter der höchsten getesteten Dosis von 240 mg Letermovir pro Tag bei guter Verträglichkeit bei keinem Patienten zu einem Prophylaxe-Versagen (Chemaly et al. 2014, Verghese u. Schleiss 2013).

## **2.4 Virostatika-resistente Zytomegalieviren**

Mit zunehmender Anwendung antiviraler Therapie ging eine gesteigerte Resistenzentwicklung des humanen Zytomegalievirus, insbesondere gegen das Nukleosidanalogen Ganciclovir, einher. Dabei beeinflussen verschiedene Faktoren das Auftreten von Resistenzen. Neben der Anwendungsdauer der Virostatika spielen auch deren antivirales Potenzial sowie der Wirkspiegel im Blut des Patienten eine Rolle. Den größten Einfluss scheint allerdings der Immunstatus des Patienten zu haben (Lurain 2010).

Steigt die Viruslast im Blut des Patienten trotz antiviraler Therapie an oder bleibt unverändert hoch, ist nach Ausschluss anderer Ursachen, wie mangelnder Compliance oder unzureichender Wirkstoffspiegel, eine Resistenzentwicklung zu vermuten. Eine entsprechende Diagnostik ist anzuschließen.

### **2.4.1 Vorkommen und Bedeutung**

Eine Resistenzentwicklung des humanen Zytomegalievirus gegen Ganciclovir wurde 1986 erstmals durch Biron et al. bei der *in vitro* Exposition des Laborstammes AD169 mit Ganciclovir beschrieben. Der hierbei selektionierte Virusstamm zeigte eine um das zehnfache verminderte Sensibilität auf Ganciclovir im Vergleich zum Wildtyp. Wenig später konnte ein resistenter Virusstamm nach Langzeittherapie immunsupprimierter Patienten mit Ganciclovir auch *in vivo* nachgewiesen werden. Hierbei kam es trotz antiviraler Therapie zu einer Krankheitsprogression

(Erice 1989). Dass bei der Entstehung Ganciclovir-resistenter HCMV-Stämme die Dauer der Therapie eine entscheidende Rolle spielt, konnte unter anderem durch Jabs et al. 1998 in einer prospektiven Studie an 76 Patienten mit HCMV-Retinitis gezeigt werden. Während sich zum Zeitpunkt der Diagnosestellung das Vorliegen Ganciclovir-resistenter Viruspopulationen auf unter 3% belief, stieg im Verlauf einer zwölfmonatigen antiviralen Therapie der Anteil resistenter Stämme auf 27% an (Jabs et al. 1998).

Derzeit stellen Transplantatempfänger die größte Risikogruppe für die Entstehung Ganciclovir-resistenter HCMV-Stämme dar (Lurain 2010). Insbesondere bei seronegativen Empfängern liegt nach Transplantation seropositiver Organe die Inzidenz für das Auftreten resistenter Viruspopulationen bei 5-10% (Boivin 2009, Limaye 2000, Lurain 2002).

In Folge einer Resistenzentwicklung kommt es zur Persistenz oder sogar zu einem Anstieg der Viruslast nach wochenlanger adäquater antiviraler Therapie. Abhängig vom Immunstatus des Patienten variiert das klinische Bild dabei zwischen asymptomatischen Infektionen, bis hin zu schweren lebensbedrohlichen Krankheitsverläufen mit diverser Organbeteiligung. Diese können nicht nur zur Abstoßung des transplantierten Organs führen, sondern auch die Mortalität betroffener Patienten steigern (Lurain 2010, Biron 2006, Gandhi u. Khanna 2004).

## **2.4.2 Resistenztestung**

Dem klinischen Verdacht auf eine Resistenzentwicklung sollten sich stets diagnostische Verfahren anschließen. Dabei kann auf zwei verschiedene Methoden der Resistenztestung zurückgegriffen werden.

### **2.4.2.1 Phänotypische Resistenztestung**

Die traditionelle phänotypische Diagnostik basiert auf der Bestimmung der Virostatika-Konzentration, die benötigt wird, um das Wachstum des Virus in Zellkultur zu hemmen. Die Methode der ersten Wahl ist hierbei der Plaque-Reduktionstest, welcher 1961 erstmals von Herrmann beschrieben wurde. Unter Zugabe unterschiedlicher Ganciclovirkonzentrationen wird dabei über die Anzahl der sich neu formierenden viralen Plaques das Viruswachstum in Zellkultur gemessen. Zur Validierung werden jeweils eine Kontrolle ohne Zugabe eines antiviralen Wirkstoffes, sowie ein sensitiver Referenzstamm, wie der HCMV-Laborstamm AD169, mitgeführt. Entscheidend ist dabei die Konzentration des Virostatikums, die mit einer Reduktion der Plaquebildung um 50% einhergeht, die sogenannte  $IC_{50}$  (50% *inhibitory concentration*).

Phänotypische Methoden sind insbesondere bei der Identifikation und Charakterisierung von neuen Mutationen, die nach antiviraler Therapie auftreten, von großer Bedeutung und somit essentiell für die Validierung genotypischer Ansätze. Aufgrund der unterschiedlichen Bedingungen in Zellkultur erweisen sie sich jedoch als unzureichend standardisierbar und sind zudem für die klinische Routinediagnostik zu zeitintensiv, weswegen man heute die genotypische Resistenztestung vorzieht.

#### **2.4.2.2 Genotypische Resistenztestung**

Hier spielen vor allem die Real-time PCR und verschiedene Methoden der DNA-Sequenzierung eine Rolle. Im Gegensatz zu phänotypischen Verfahren, bei denen die Ergebnisse nicht selten erst nach 4 bis 6 Wochen vorliegen (Lurain 2010), kann mit genotypischen Methoden ein mutierter Virusstamm in einem Zeitfenster von wenigen Stunden bis zu 3 Tagen identifiziert und objektiviert werden. Nachteil ist jedoch die fehlende Differenzierungsmöglichkeit zwischen natürlichen Polymorphismen im Virusgenom und Resistenz-assoziierten Mutationen. Ob eine neu entdeckte Mutation tatsächlich Einfluss auf die antivirale Wirkung eines Virostatikums hat, kann nach wie vor nur durch phänotypische Testung ermittelt werden.

Als alternative Methode zur Mutationsanalyse im ORF UL97 publizierten Göhring et al. 2006 und 2008 die Schmelzkurvenanalyse mittels Real-time PCR. Unter Verwendung verschieden farbig markierter Sonden können spezifische Mutationsstellen auch bei Vorliegen gemischter Viruspopulationen semiquantitativ und simultan analysiert werden. Tritt eine Mutation auf, wird die Bindung zwischen Sonde und Virus-DNA instabil, was sich in einer Verringerung der Schmelztemperatur manifestiert (Göhring 2006).

Als Standardverfahren der klinischen, genotypischen Mutationsdiagnostik gilt derzeit die DNA Sequenzierung, wobei insbesondere die Didesoxysequenzierung nach Sanger die breiteste Anwendung findet. Über die Analyse der genauen Nukleotidabfolge im Virusgenom können Mutationen direkt identifiziert werden. Ferner ist eine Abgrenzung mutierter Virusstämme in Subpopulation neben dem Wildtyp mit verfahrensspezifischer Sensitivität möglich. Pro Sequenzierlauf kann in der Sanger-Sequenzierung etwa 1kb Daten generiert werden.

Zunehmend populärer wurde in den letzten Jahren zudem die Pyrosequenzierung. Basierend auf dem Prinzip *sequencing-by-synthesis* ist mit ihrer Hilfe insbesondere die Detektion minoritärer Mutantenanteile in Mischpopulation möglich.

### **2.4.3 Next Generation Sequencing (Hochdurchsatz-Sequenzierung)**

In den letzten Jahren wurden basierend auf verschiedenen Detektionstechniken zunehmend Methoden zur Hochdurchsatz-Sequenzierung (Next Generation Sequencing) entwickelt, die es ermöglichen, Millionen von DNA-Fragmenten parallel zu sequenzieren. Dabei generieren moderne Geräte Daten von bis zu mehreren hundert Gigabasenpaaren in nur einem Sequenzierlauf (Shokralla et al. 2012).

Mit Hilfe der Amplicon-Sequenzierung ist es heute möglich, in einem Gemisch aus Amplifikaten jedes der amplifizierte Moleküle einzeln zu sequenzieren und damit auch geringe Anteile von mutierten Virusstämmen in mischinfiziertem Patientenmaterial zu detektieren.

### **2.4.4 Molekulargenetischer Hintergrund**

Resistenz-bedingende Mutationen des humanen Zytomegalievirus sind derzeit für die ORFs UL97 und UL54 bekannt. Um die Resistenzentwicklung gegenüber Ganciclovir gänzlich zu verstehen, ist es unumgänglich, den genauen Wirkungsmechanismus dieses Virostatikums zu betrachten. Wie bereits erwähnt, benötigt das Nukleosidanalogen zur Aktivierung seiner antiviralen Wirkung eine initiale Phosphorylierung durch die im viralen ORF UL97 kodierte Phosphotransferase. Kommt es im Zuge einer Punktmutation oder Deletion im ORF zu einem Funktionsverlust des Enzyms, kann Ganciclovir nicht aktiviert werden und zeigt dementsprechend keine oder eine nur verminderte Wirkung. Da andere antivirale Wirkstoffe, wie Foscarnet oder Cidofovir keiner initialen Aktivierung bedürfen, liegt eine Resistenz in diesem Fall isoliert für Ganciclovir und dessen orales Prodrug Valganciclovir vor. Anders verhält es sich bei Mutationen in funktionellen Domänen des ORFs UL54. Diese können zu potenziellen Wirkungseinschränkungen aller drei Pharmaka führen, da sie den gemeinsamen Angriffspunkt, die virale DNA-Polymerase, betreffen (Chevillotte 2010). Da UL54-Mutationen in der Regel erst im Anschluss an eine bereits bestehende Mutation im ORF UL97 entstehen und zudem in ihrer Lokalisation ein sehr variables Verteilungsmuster aufweisen (Erice 1997), beschränkte man sich bei der klinischen Diagnostik lange Zeit auf die genotypische Resistenztestung im UL97-Gen.

### **2.5 Genprodukt pUL97**

Das Genprodukt des ORF UL97 ist ein etwa 80 kDa großes Protein, bestehend aus 707 Aminosäuren. Als Serin/Threonin-Kinase phosphoryliert es neben viralen und zellulären Proteinen, die im viralen Replikationszyklus benötigt werden (Prichard et al. 2008), auch die Nukleosidanaloga Ganciclovir und Aciclovir (Littler et al. 1992, Talarico et al. 1999). Es konnte jedoch keine derartige Funktion in Hinblick auf natürliche Nukleoside, wie Adenosine oder

Guanosine, nachgewiesen werden (Michel 1996). 1999 untersuchten Prichard et al die Funktion rekombinanter Viren, denen bis zu 70% des UL97 Gens fehlte und stellten ein deutliches Replikationsdefizit der Viren in Fibroblasten fest. Zudem konnten Marschall et al 2003 eine Interaktion des Proteins mit pUL44 nachweisen, welches als Aktivator der viralen DNA-Polymerase eine essentielle Funktion im Replikationszyklus hat. Ein weiteres Substrat von pUL97 ist der Transkriptionsfaktor pUL69, welcher zudem als Transportfaktor für mRNA agiert. Das Zusammenwirken beider Proteine veranlasst dabei eine Aktivitätssteigerung von pUL69 im Hinblick auf dessen Exportfunktion für virale mRNA (Thomas 2009). Nicht zuletzt wird auch Lamin A/C, ein Protein der Kernmembran, durch pUL97 phosphoryliert. Dies fördert durch Porenbildung in der Kernmembran die Freisetzung replizierter Viruspartikel ins Zytoplasma der Wirtszelle (Wolf 2001, Krosky 2003).

Insgesamt kommt pUL97 eine wichtige Rolle im viralen Replikationszyklus zu, allerdings konnte eine *in vitro* durchgeführte Deletion von UL97 die Replikation von HCMV nicht vollständig unterdrücken (Prichard 2009).

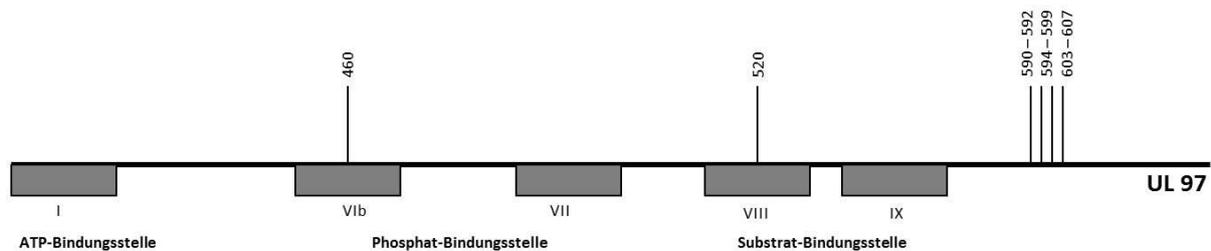
### **2.5.1 pUL97: Ganciclovir-Resistenz-bedingende Mutationen**

Die erste Ganciclovir-Resistenz eines HCMV Stammes wurde 1986 durch Biron et al. in Zellkultur nachgewiesen. Nach Vermehrung des Laborstammes AD169 unter GCV- Exposition zeigte sich eine durch Selektion des resistenten Stammes B750rD100 um das 10-fache verminderte Empfindlichkeit des Virus gegenüber dem Virostatikum verglichen mit AD169 (Biron et al. 1986). Durch Klonierung des veränderten Stammes konnte eine 12bp lange Deletion der Codons 590-593 im ORF UL97 aufgezeigt werden, aus der eine verminderte Phosphorylierung von GCV resultierte (Sullivan et al. 1992, Biron et al. 1986).

Die betroffene Region scheint dabei für die virale Replikation bedeutungslos, jedoch liegt in diesem Bereich des ORFs die Substraterkennungssequenz für GCV, was eine durch Mutationen verminderte Phosphorylierung des Virostatikums plausibel macht (Chou et al. 2002 und 2008).

Ebenfalls in Laborstämmen wurden später Resistenz-bedingende Mutationen im Codon 460 entdeckt, welche in der katalytischen Region des Gens lokalisiert sind und die Phosphatbindungsstelle betreffen (Lurain 1994). Ein entsprechender Aminosäureaustausch von Methionin zu Isoleucin bzw. Valin in der Phosphat-Transfer-Region des Genprodukt pUL97 (funktionelle „Hanks“ Domäne VIb) (Hanks et al. 1988) bedingt durch ein verändertes Phosphorylierungsverhalten eine verminderte Aktivierung von GCV, aus der eine herabgesetzte Empfindlichkeit des mutierten Virusstammes gegenüber GCV resultiert.

Wenig später wurden auch aus klinischen Proben Ganciclovir-resistente HCMV-Stämme isoliert, die Punktmutationen im ORF UL97 aufwiesen. In den entsprechenden Proben von AIDS-Patienten fand man die Mutationen A594V und L595S in der Substraterkennungssequenz, sowie H520Q, welche die Substratbindungsstelle des Genproduktes pUL97 betrifft (Chou et al. 1995; Hanson et al. 1995). Abbildung 2.2 zeigt die funktionellen Domänen im ORF UL97, sowie die Lage der häufigsten Mutationen.



**Abb. 2.2 HCMV UL97: funktionelle Domänen, deren mögliche Funktion und Resistenz-assoziierte Mutationsloci** [Modifiziert nach Chou, *JA Reviews in Medical Virology*, Vol. 18, 2008]

*UL97: HCMV-Gen, welches für eine Proteinkinase kodiert, I-IX: funktionelle Domänen, ATP: Adenosintriphosphat, 460-607: Aminosäure-Positionen*

Bei Patienten nach Organtransplantation wurde die Häufigkeit für das Auftreten GCV-resistenter HCMV-Stämme zwischen 5-12,5% beschrieben. Seltener (<5%) finden sich resistente Stämme bei Stammzelltransplantierten (Sahoo 2013, Lurain 2010, Limaye 2000). Insgesamt konnten bei über 90% der GCV-resistenten HCMV-Isolate Mutationen im Phosphotransferase-Gen UL97 nachgewiesen werden (Gilbert u. Boivin 2005).

Die klinisch am häufigsten detektierten Mutationen sind M460I/V, H520Q, A594V, L595S und C603W, welche die mittlere inhibitorische Konzentration von GCV (IC<sub>50</sub>) jeweils um das 5-10-fache erhöhen. Hinzu kommt die zum Aminosäureaustausch im Codon 592 führende Punktmutation C592G, die eine Erhöhung der IC<sub>50</sub> für GCV auf das 2- bis 3-fache zur Folge hat. Neben den genannten Punktmutationen gibt es seltenere Varianten im Bereich der Codons 590-607, die ebenfalls zu einer etwa 2 bis 3-fach erhöhten IC<sub>50</sub> führen. Ausnahme bilden die sowohl in Laborstämmen, als auch in klinischen Proben detektierten Codon-Deletionen in diesem Bereich, aus denen ein zum Teil erhebliches Resistenzpotenzial resultiert. Dabei handelt es sich um Deletionen von bis zu zehn Codons, die nicht mit Leserasterverschiebungen einhergehen (Chou et al. 2002 u. 2005; Gilbert et al. 2002; Lurain et al. 2002). Tabelle 2.1 zeigt eine Übersicht aktuell anerkannter Mutationen im ORF UL97, deren Vorkommen sowie Resistenzpotenzial anhand ermittelter IC<sub>50</sub>-Werte und Restphosphorylierungskapazitäten.

**Tabelle 2.1 GCV-Resistenz-assoziierte Mutationen im ORF UL97, ihr Vorkommen und Resistenzpotenzial**

Quelle: (1) Prozentangabe bezogen auf GCV-resistente HCMV-Isolate, n=76, Chou et al., Rev. Med. Virol, Vol.18, 2008, (2) Baldanti et al., Antiviral Research, Vol. 54, 2002

Mutante	Vorkommen in %	Mutante/Wildtyp GCV-IC <sub>50</sub> Ratio(1)	Restphosphorylierungskapazität in %(2)
M460I	9,2	5	14,5
M460V	14,5	8,3	9,3
H520Q	5,2	10	5,2
A591V	2,6	1,3	-
C592G	13,2	2,9	32,7
A594G	0	14	-
A594T	1,3	2,7	-
A594V	30,3	8,3	18,4
L595F	3,9	16	28,3
L595S	23,7	9,2	15,8
L595W	2,6	5,1	-
E596G	1,3	2,3	-
G598S	-	1	51,8
K599T	0	5,3	-
C603W	2,6	8	-
C607F	1,3	1,9	-
C607Y	1,3	13	31,9
590-593del	1,3	3 bis 10	10,6
595del	-	13	18
595-603del	-	8,4	-
600del	1,3	1,9	-
601-603del	-	15	-

Da die Bestimmung der Restphosphorylierungskapazität mit Hilfe rekombinanter, pUL97-exprimierender Vaccinia-Viren erfolgt, findet hier die Beurteilung der GCV-Phosphorylierung allein in Abhängigkeit von UL97 als viralem Einflussfaktor statt, während bei der Ermittlung der IC<sub>50</sub> weitere HCMV-spezifische Faktoren berücksichtigt werden müssen. Dies scheint daher die präzisere Methode zur Beurteilung des Resistenzpotenzials einzelner Mutationen zu sein (Baldanti et al. 2002).

Insgesamt scheinen mit einer GCV-Resistenz-assoziierte Mutationen im ORF UL97 in Bereichen des Gens aufzutreten, in denen sie die biologische Funktion von pUL97 nicht beeinträchtigen. 1998 konnten Michel et al. nachweisen, dass die beiden Mutationen M460V und H520Q zwar die Phosphorylierung von GCV beeinträchtigen, jedoch keinen Einfluss auf die Autophosphorylierung von pUL97 haben (Michel et al. 1998). Letztlich stellt sich bei jeder neu entdeckten Mutation die Frage nach deren Effekt auf die Proteinfunktion, sowie auf die Wirksamkeit von Ganciclovir. Dabei muss auch die Interaktion bestehender Mutationen beachtet

werden. 2002 konnten Ijichi et al. ebenfalls in einem Vaccinia-Virus-System die kompensatorische Wirkung der Mutation D605E nachweisen, deren synchrones Auftreten mit der Mutation A594P die Restphosphorylierungskapazität des doppelmutierten Virusstammes um 20% gegenüber der einfachen A594P-Mutante heraufsetzt. Ein nur im Codon 605 mutiertes, rekombinantes Vaccinia-Virus zeigte sich sogar sensitiver gegenüber GCV als der Wildtyp (Ijichi et al. 2002).

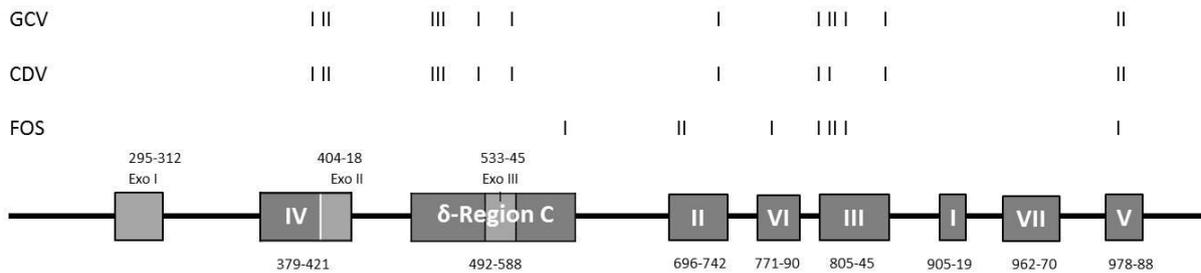
## **2.6 Genprodukt pUL54**

Der ORF UL 54 kodiert für die virale DNA Polymerase. Sie ist im Infektionszyklus für die virale DNA Replikation zuständig (Lurain 2010). Nach dem Prinzip der homologen Basenpaarung baut sie die entsprechenden Nukleotidtriphosphate unter Abspaltung von Pyrophosphat in den synthetisierenden DNA-Strang ein und verfügt zudem über eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität. Diese interne Fehlerkontrolle ermöglicht der Polymerase das Erkennen und Entfernen falsch eingebauter Nukleotide und sichert so eine hohe Genauigkeit der Replikation. Infolge dessen wird die Mutationsrate gering gehalten.

### **2.6.1 pUL54: Ganciclovir-Resistenz-bedingende Mutationen**

Der erste in vitro herangezogene GCV-resistente Virusstamm 759rD100 zeigte neben der beobachteten UL97-Mutation eine zusätzliche Mutation in Region V des viralen DNA-Polymerase-Gens (pol Gen) UL54. Für die Punktmutation A987G konnte sowohl eine Resistenz gegen GCV, als auch gegen CDV nachgewiesen werden. (Sullivan et al. 1993). Kurze Zeit später wurde immer wieder von neuen im pol Gen mutierten Virusstämmen berichtet, die unter GCV-Exposition in vitro auftraten und eine im Vergleich zum Wildtyp AD169 reduzierte Empfindlichkeit gegenüber dem Virostatikum entwickelten. Sie wiesen u.a. die Punktmutationen F412V, L501I, L545S und V812L auf (Cihlar 1998a, Lurain 1992, Gilbert 2005).

Anders als beim ORF UL97 handelt es sich beim ORF UL54 um ein Gen, welches ubiquitär zahlreiche natürliche Polymorphismen, aber auch Mutationen aufweist (Chou 1999). Zudem treten Resistenz-assoziierte Mutationen im Polymerase-Gen klinisch seltener und meist in Zusammenhang mit UL97 Mutationen auf (Cihlar 1998b, Smith 1997). Für die Mehrzahl der detektierten Mutationen wurden in der Folge neben einer Resistenz gegenüber GCV, auch für andere Virostatika wie CDV, FOS oder Adefovir herabgesetzte Empfindlichkeiten beschrieben. Mit wenigen Ausnahmen liegen all diese Resistenz-assoziierten Mutationen innerhalb der acht konservierten Regionen des HCMV pol Gens (Abb.2.3).



**Abb. 2.3 HCMV UL54: funktionelle Domänen und Resistenz-assoziierte Mutationsloci** [Modifiziert nach Gilbert et al, Drug Resistance Updates, Vol.5, 2002]

*GCV: Ganciclovir, CDV: Cidofovir, FOS: Foscarnet, I-VII und  $\delta$ -Region C: funktionelle Domänen, 295-988: Nummer der Codons in den funktionellen Domänen, Exo I-III: Exons I-III, die eingezeichneten Striche markieren die Positionen der häufigsten Resistenz-assoziierten Mutationen für GCV, CDV und FOS*

Dabei führen Mutationen, welche die Regionen IV, V und die N-terminalen Bereiche der  $\delta$ -Region C betreffen sowohl zu einer GCV- als auch zur CDV-Resistenz. Mutationen in den Regionen II, VI und den C-terminalen Abschnitten der  $\delta$ -Region C sind hingegen vorrangig mit Resistenzen gegenüber Foscarnet und Adefovir assoziiert. Betreffen die den Aminosäureveränderungen zugrunde liegenden Mutationen die konservierte Region III wurden diverse Resistenzen beobachtet. Vereinzelt führen Punktmutationen in diesem Bereich, wie beispielsweise die Mutante V812L, sogar zu einer Multidrug-Resistenz gegen alle vier genannten Virostatika (Gilbert 2002). Auch Boivin et al. fanden die mit einer GCV-Resistenz-assoziierten Mutationen mehrheitlich in den konservierten Bereichen zwischen Codon 395-545 und 809-987 (Boivin 2005). Tabelle 2.2 gibt einen Überblick über Resistenz-assoziierte Mutationen im ORF UL54, deren Lage innerhalb des pol Gens und ihres Resistenzspektrums.

**Tabelle 2.2 Resistenz-assoziierte Mutationen im HCMV DNA Polymerase Gen (UL54)**

Quelle: zusammengestellt aus Lurain et al., *Clin.Microbiol.Rev.*, Vol.23, 2010; Gilbert et al., *Drug Resistance update*, Vol.5, 2002 und Chou, *Journal of Clinical Virology*, Vol.50, 2011.

\* Mutationen, die bisher nicht in klinischen Isolaten nachgewiesen wurden.

Mutante	konservierte Region	Resistenzspektrum (R=resistent, S=sensibel)		
		GCV	CDV	FOS
D301N	Exo I	R	R	S
C304S	Exo I	R	R	R
M393R	IV	R	R	R
M393K	IV	R	R	R
N408K	Exo II	R	R	S
N408D	Exo II	R	R	S
N410K	Exo II	R	R	S
F412C	Exo II	R	R	S
F412L	Exo II	R	R	S
F412S	Exo II	R	R	S
F412V*	Exo II	R	R	S
D413A	Exo II	R	R	S
D413E	Exo II	R	R	S
N495K	$\delta$ -Region C	S	S	R
L501F	$\delta$ -Region C	R	R	S
L501I	$\delta$ -Region C	R	R	S
T503I	$\delta$ -Region C	R	R	S
K513E	$\delta$ -Region C	R	R	S
K513N*	$\delta$ -Region C	R	R	S
K513R	$\delta$ -Region C	R	R	S
D515E	$\delta$ -Region C	R	R	R
L516M	$\delta$ -Region C	R	R	R
L516R	$\delta$ -Region C	R	R	S
I521T	$\delta$ -Region C	R	R	S
P522S	$\delta$ -Region C	R	R	S
P522A	$\delta$ -Region C	R	R	S
L545W	Exo III	R	R	S
L545S	Exo III	R	R	S
Q578H	$\delta$ -Region C	R	R/S	R
D588E	$\delta$ -Region C	S	S	R
D588N	$\delta$ -Region C	R	R	R
T700A	Region II	S	S	R
V715M	Region II	S	S	R
I722V	Region II	R	R	S
Y751H	Region II-VI	R	R	S
E756K	Region II-VI	R	R	R
E756D	Region II-VI	S	S	R
E756Q	Region II-VI	S	S	R
L776M	Region VI	R	S	R
V781I	Region VI	R	S	R
V787L	Region VI	R	S	R
L802M	Region VI-III	R	S	R
K805Q	Region III	S	R	S
A809V	Region III	R	S	R

V812L	Region III	R	R	R
T813S	Region III	R	R	R
T821I	Region III	R	S	R
A834P	Region III	R	R	R
T838A	Region III	S	S	R
G841A	Region III	R	R	R
S897P	Region III-I	R	R	R
981-982del	Region V	R	R	R
A987G	Region V	R	R	S
R1052C	hinten V	R	R	R

Die Lage der Resistenz-bedingenden Mutationen in konservierten Bereichen des pol Gens warf die Diskussion um den Einfluss einzelner Mutationen auf die biologische Funktion der Polymerase und damit auf die Virusreplikation auf. 1996 konnten Baldanti et al. anhand dreier klinischer HCMV Isolate aufzeigen, dass die Mutationen T700A und V715M, beide in Region II gelegen, die Wachstumsgeschwindigkeit der betroffenen Virusstämme in Zellkultur verlangsamt. Cihlar et al. wiesen zudem für die rekombinante UL54 Mutante K513N eine herabgesetzte extrazelluläre Virionenproduktion im Vergleich zum Wildtyp nach.

## 2.7 Aufgabenstellung

In den letzten Jahrzehnten entwickelte sich die Sanger-Sequenzierung als genotypisches Nachweisverfahren in der medizinischen Diagnostik Ganciclovir-resistenter HCMV Stämme zum Goldstandard. Aufgrund ihrer vergleichsweise geringen Sensitivität weist diese Methode jedoch Schwächen in der Detektion geringer Anteile resistenter Virusmutanten in Anwesenheit eines Wildtypüberschusses auf. Ziel dieser Arbeit war es daher die Pyrosequenzierung mit vorgeschalteter PCR als neueres Sequenzierverfahren zu evaluieren, um das Auftreten von resistenten Virusstämmen im zeitlichen Verlauf einer Primärinfektion oder auch Reaktivierung früher erfassen zu können und ggf. mit einer frühzeitigen Therapieumstellung ein besseres Outcome für betroffene Patienten zu erreichen. Dazu wurden uns vom virologischen Institut der Charité Berlin 180 Proben Organ- oder Stammzelltransplantierte Patienten zur Verfügung gestellt, bei denen man trotz antiviraler Therapie eine Persistenz bzw. einen Anstieg der Viruslast beobachten konnte.

Diese galt es zunächst über eine Real-time PCR erneut zu quantifizieren. Im Anschluss wurden die Proben sowohl mit Hilfe der Sanger-Sequenzierung, als auch der Pyrosequenzierung analysiert, um häufige Resistenz-assoziierte Mutationen im ORF UL97 in Mischpopulationen von Wildtyp und Mutante nachzuweisen. Insbesondere der Zeitpunkt des erstmaligen Nachweises der Mutante in den verschiedenen Sequenzierverfahren war dabei von Interesse.

Anschließend wurden einige Proben, die in der Pyrosequenzierung zeitlich früher Mutationen zeigten als im Verfahren nach Sanger, zusätzlich über ein Verfahren des Next Generation Sequencing analysiert.

Bestimmte Proben sollten anschließend kloniert werden, um bei Proben bei denen mehrere Punktmutationen gefunden wurden, eine Doppelmutante von einem eventuellen Auftreten zweier separat mutierter HCMV Stämme unterscheiden zu können.

Zudem wurden Proben mit hoher Viruslast, unabhängig von vorliegenden UL97-Mutationen, auf das Vorhandensein von Mutationen im ORF UL54 untersucht.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Probenmaterial

Das Probenmaterial wurde vom Institut für Virologie der Charité Berlin gestellt. Es stammte von Patienten, die aufgrund einer Immunsuppression, im Rahmen einer Organ- oder Stammzelltransplantation oder HIV-Infektion, auf das Vorhandensein von HCMV getestet wurden. Die DNA-Extraktion aus humanem Plasma, Leukozyten, Urin, Liquor sowie Nasen- und Rachenabstrichen wurde zu einem Teil durch das Institut für Virologie der Charité durchgeführt. Einzelne Proben wurden zudem im Robert Koch Institut extrahiert.

**Tab. 3.1** Auflistung der untersuchten Patientenproben

Patient	Probennr.	Entnahmetag vor/nach TX	Material	Patient	Probennr.	Entnahmetag vor/nach TX	Material
1	hu 3513	22	EDTA-Plasma	7	hu 3521	-133	Serum
	hu 3514	30	CB-Plasma		hu 3522	-133	EDTA-Plasma
	hu 3516	37	EDTA-Plasma		hu 3523	-133	EDTA-Plasma
	hu 3517	43	CB-Plasma		hu 3524	-127	EDTA-Plasma
	hu 3518	46	Urin		hu 3525	-127	EDTA-Plasma
	hu 3520	80	Abstrich Nase		hu 3526	-120	EDTA-Plasma
2	hu 3587	-21	CB-Plasma		hu 3527	-120	EDTA-Plasma
	hu 3588	9	CB-Plasma		hu 3528	-113	EDTA-Plasma
	hu 3589	14	CB-Plasma		hu 3529	-113	EDTA-Plasma
	hu 3590	27	CB-Plasma		hu 3530	-99	EDTA-Plasma
	hu 3591	31	Urin		hu 3531	-92	EDTA-Plasma
	hu 3593	35	CB-Plasma		hu 3532	-74	EDTA-Plasma
3	hu 3595	38	CB-Plasma		hu 3533	-69	EDTA-Plasma
	hu 3673	11	EDTA-Plasma		hu 3534	-57	EDTA-Plasma
	hu 3674	18	EDTA-Plasma		hu 3535	0	CB-Plasma
	hu 3675	29	EDTA-Plasma		hu 3536	7	Serum
	hu 3676	36	EDTA-Plasma		hu 3537	43	Serum
	hu 3677	40	EDTA-Plasma		hu 3538	43	CB-Plasma
	hu 3678	43	EDTA-Plasma		hu 3540	55	EDTA-Plasma
	hu 3679	47	EDTA-Plasma		hu 3541	55	Serum
	hu 3680	51	EDTA-Plasma		hu 3542	56	Serum
	hu 3681	54	EDTA-Plasma		hu 3543	91	CB-Plasma
	hu 3682	64	EDTA-Plasma		hu 3544	104	Serum
	hu 3683	85	EDTA-Plasma		hu 3546	111	CB-Plasma
	hu 3684	92	EDTA-Plasma		hu 3547	233	EDTA-Plasma
	hu 3685	99	EDTA-Plasma		hu 3549	293	CB-Plasma
	hu 3686	106	EDTA-Plasma		hu 3550	293	Serum
	hu 3687	111	EDTA-Plasma		hu 3948	451	EDTA-Plasma
	hu 3688	114	EDTA-Plasma	hu 3949	482	EDTA-Plasma	
	hu 3689	117	EDTA-Plasma	hu 4160	649	EDTA-Plasma	
	hu 3965	120	EDTA-Plasma	hu 4161	671	EDTA-Plasma	
	hu 3966	121	EDTA-Plasma	8	hu 3712	25	EDTA-Plasma
	hu 3967	124	EDTA-Plasma		hu 3713	32	EDTA-Plasma
	hu 3968	133	Liquor		hu 3714	47	CB-Plasma
	hu 3969	138	EDTA-Plasma		hu 3715	54	CB-Plasma
	hu 3551	2	EDTA-Plasma		hu 3716	56	CB-Plasma

4	hu 3552	6	EDTA-Plasma
	hu 3553	9	EDTA-Plasma
	hu 3554	13	Serum
	hu 3555	14	EDTA-Plasma
	hu 3556	15	Abstrich
	hu 3557	20	EDTA-Plasma
	hu 3558	22	EDTA-Plasma
	hu 3559	23	EDTA-Plasma
	hu 3560	29	EDTA-Plasma
	hu 3561	30	EDTA-Plasma
	hu 3562	33	EDTA-Plasma
	hu 3563	38	EDTA-Plasma
	hu 3564	41	Serum
5	hu 3565	14	EDTA-Plasma
	hu 3566	21	EDTA-Plasma
	hu 3567	28	EDTA-Plasma
	hu 3568	30	EDTA-Plasma
	hu 3569	32	EDTA-Plasma
	hu 3570	32	EDTA-VB
	hu 3571	37	EDTA-Plasma
	hu 3572	39	EDTA-Plasma
	hu 3573	42	EDTA-Plasma
	hu 3574	46	EDTA-Plasma
	hu 3575	51	EDTA-Plasma
	hu 3576	63	EDTA-Plasma
	hu 3577	74	EDTA-Plasma
	hu 3578	77	EDTA-Plasma
	hu 3579	99	EDTA-Plasma
	hu 3580	101	EDTA-Plasma
	hu 3581	102	EDTA-VB
	hu 3582	105	EDTA-Plasma
	hu 3583	107	EDTA-Plasma
	hu 3584	108	EDTA-Plasma
hu 3585	112	EDTA-Plasma	
hu 3586	115	EDTA-Plasma	
6	hu 3596	-10	EDTA-Plasma
	hu 3597	-6	EDTA-Plasma
	hu 3598	-3	EDTA-Plasma
	hu 3599	1	EDTA-Plasma
	hu 3601	4	EDTA-Plasma
	hu 3602	11	Urin
	hu 3603	15	EDTA-Plasma
	hu 3604	18	EDTA-Plasma
	hu 3605	22	EDTA-Plasma
	hu 3606	25	EDTA-Plasma
	hu 3607	29	EDTA-Plasma
	hu 3608	32	EDTA-Plasma
	hu 3609	36	EDTA-Plasma
	hu 3610	37	EDTA-Plasma
	hu 3611	39	EDTA-Plasma
	hu 3612	43	EDTA-Plasma
	hu 3613	46	EDTA-Plasma
	hu 3614	50	EDTA-Plasma
	hu 3615	53	EDTA-Plasma
	hu 3616	57	EDTA-Plasma
hu 3618	60	EDTA-Plasma	
hu 3619	64	EDTA-Plasma	
hu 3620	67	EDTA-Plasma	
	hu 3717	60	CB-Plasma
	hu 3718	63	EDTA-Plasma
	hu 3719	68	EDTA-Plasma
	hu 3827	71	EDTA-Plasma
	hu 3828	78	EDTA-Plasma
	hu 3829	83	EDTA-Plasma
	hu 3830	88	EDTA-Plasma
	hu 3831	90	EDTA-Plasma
	hu 3832	95	EDTA-Plasma
	9	hu 3962	35
hu 3963		44	EDTA-Plasma
hu 3964		52	EDTA-Plasma
10	hu 4159	59	EDTA-Plasma
	hu 3970	155	EDTA-Plasma
	hu 3971	195	EDTA-Plasma
	hu 3972	225	EDTA-Plasma
	hu 3973	238	EDTA-Plasma
11	hu 3974	245	EDTA-Plasma
	hu 3975	28	EDTA-Plasma
	hu 3976	35	EDTA-Plasma
	hu 3977	71	EDTA-Plasma
	hu 3978	85	EDTA-Plasma
	hu 3979	102	EDTA-Plasma
	hu 3980	106	EDTA-Plasma
	hu 3981	109	EDTA-Plasma
	hu 3982	113	EDTA-Plasma
	hu 3983	121	EDTA-Plasma
	hu 3984	127	EDTA-Plasma
	hu 3985	150	EDTA-Plasma
	hu 3986	162	EDTA-Plasma
	hu 3987	171	EDTA-Plasma
	hu 3988	175	EDTA-Plasma
12	hu 3989	180	EDTA-Plasma
	hu 3990	182	EDTA-Plasma
	hu 3991	13	EDTA-Plasma
	hu 3992	21	EDTA-Plasma
	hu 3993	41	EDTA-Plasma
	hu 3994	76	EDTA-Plasma
	hu 3995	86	EDTA-Plasma
	hu 3996	97	EDTA-Plasma
	hu 3997	104	EDTA-Plasma
	hu 3998	111	EDTA-Plasma
13	hu 3999	115	EDTA-Plasma
	hu 4000	121	EDTA-Plasma
	hu 4001	1	EDTA-Plasma
	hu 4002	21	EDTA-Plasma
	hu 4003	26	EDTA-Plasma
	hu 4004	36	EDTA-Plasma
	hu 3960	41	EDTA-Plasma
	hu 3961	51	EDTA-Plasma

### 3.1.2 Bakterienstämme

Bei den für die Klonierung zur Transformation verwendeten Bakterienstämmen handelte es sich um die E.coli-Stämme TOP 10 und DH5 $\alpha$ , Invitrogen, Carlsbad CA.

### 3.1.3 Primer und Sonden

Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion International AG, Martinsried/D, als 100  $\mu$ M Lösung in ddH<sub>2</sub>O bzw. in lyophilisiertem Zustand bezogen. Es erfolgte eine Verdünnung der Stammlösung auf eine Endkonzentration von 10  $\mu$ M und die anschließende Lagerung bei -20 °C. Tab. 3.2 – 3.7 geben eine Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit zu verschiedenen Anwendungen benötigten Primer.

**Tab. 3.2 Primer zur Klonierung in pCR $\text{\textcircled{R}}$ 2.1-TOPO $\text{\textcircled{R}}$  und zur Sanger-Sequenzierung des ORF UL97**

*s:sense, as: antisense; bp: Basenpaare; Tm: Schmelztemperatur*

Primer	Sequenz (5'→3')	Zielgen	Produktgröße	Tm	nested PCR
4134 s	TCGACGTTTCCACACAGACATG	ORF UL97	729 bp	62°C	1.Runde
4134 as	GTGGTAGAAGCGGCGAAAGG			63°C	
4135 s	TTTCATCACGACCAGTGGAAAG	ORF UL97	680 bp	59°C	2.Runde bzw. Seq-Primer
4135 as	GCGACACGAGGACATCTTGG			63°C	

**Tab. 3.3 Primer für die nested PCR für die Sanger-Sequenzierung des ORF UL54**

*s:sense, as: antisense; bp: Basenpaare; Tm: Schmelztemperatur*

Primer	Sequenz (5'→3')	Zielgen	Produktgröße	Tm	nested PCR
5807 s	GGTTTGGCCGTGTCCTTGGC	ORF UL54	3456 bp	57-58°C	1.Runde
5807 as	GGCAGAAAAGCCGGCTCCAA			57-58°C	
5808 s	CTTCGGGGAACGTGTTGCGT	ORF UL54	3149 bp	58°C	2.Runde
5808 as	GCGCACGTAGCTCGGATCTT			58°C	
5894 s	TTTCGGGCAGCGCAGCTACT	ORF UL54	2968bp	59-63°C	3.Runde
5894 as	GTCAGCGTCGTCGTCCTGC			61-67°C	

**Tab. 3.4 Primer zur Sanger-Sequenzierung des ORF UL54***s:sense, as: antisense; bp: Basenpaare; Tm: Schmelztemperatur*

Primer	Sequenz (5'→3')	Zielgen	Produktgröße	Tm
5894-s 5894-as	TTTCGGGCAGCGCAGCTACT GTCAGCGTCGTCGTCCGTGC	ORF UL54	2968bp	59-63°C 61-67°C
5866-s 5866-as	CGTTACGACTGGCGGCAGCA CGGCCCTCGGCATTAGCCAC	ORF UL54	818 bp	60°C 60°C
5867-s 5867-as	GTGGCTAATGCCGAGGGCCG ACGCTGTCCGTGTCCCCGTA	ORF UL54	1166 bp	60°C 60°C
5868-s	ATGCCGTGTCTGCCCATCGC	ORF UL54	1218 bp	60°C
5869-as	GCGATGGGCAGACACGGCAT	ORF UL54	1724 bp	60°C
5870-s	TACGGGGACACGGACAGCGT	ORF UL54	987 bp	60°C

**Tab. 3.5 Primer zur konventionellen PCR für die PSQ***s:sense, as: antisense; bp: Basenpaare; Tm: Schmelztemperatur*

Primer	Sequenz (5'→3')	Zielgen	Produktgröße	Tm
4287 bios 4288 as	Biotin-TGTATGCCACTTTGAYATTACACCC CCTGAA AGACGGCCACAC	ORF UL97	107 bp	63°C 58°C
4294 bios 4294 as	Biotin-CCG TCT GCG CGA ATG TTA CGACATGCA ATA ACGCCG	ORF UL97	79 bp	56°C 56°C
4298 bios 4302 as	Biotin-GGYACGGAGGCGTTGCT GCCGCCAGA ATGAGCAGA	ORF UL97	69 bp	58°C 58°C

**Tab. 3.6 Primer und Sonde zur Real-time PCR für die PSQ***s:sense, as: antisense; bp: Basenpaare; Tm: Schmelztemperatur*

Primer	Sequenz (5'→3')	Zielgen	Produktgröße	Tm
4294 bios 4294 as	Biotin-CCG TCT GCG CGA ATG TTA CGACATGCA ATA ACGCCG	ORF UL97	79 bp	56°C 56°C
4293 s	F-CTGCTCATCTGCGACC MGB	ORF UL97		68°C

**Tab. 3.7 Sequenzierprimer für die PSQ**

s: sense, as: antisense; bp: Basenpaare; Tm: Schmelztemperatur, SNP: Single Nucleotide Polymorphism

Primer	Sequenz (5'→3')	Zielgen	SNP Codon	Tm
4289as	TCACGTCGATGAGCA	ORF UL97	460	46°C
4295as	RGGTCGGAAAGCAGG	ORF UL97	520	51°C
4434as	CCGCCAGAATGAGCAG	ORF UL97	592-607	53°C

**Tab. 3.8 Fusionsprimer zur Amplicon-Sequenzierung (NGS)**

F: forward, R: reverse, MID: multiplex identifier, bp: Basenpaare, Tm: Schmelztemperatur

grün: Adaptersequenz Primer A; orange: Adaptersequenz Primer B; blau: TCAG Schlüsselsequenz zur Amplicon-Sequenzierung; schwarz: MID, Erkennungssequenz; rot: Zielsequenz

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Zielgen	Produktgröße	Tm
460_1F_MID1	CGFATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAGACGAGTGCGTGTGCTCACGGTCTGGATGT	ORF UL97	360 bp	61°C
460_1R_MID1	CTATGCGCCTTGCCA GCCCGCTCAGACGAGTGCGT CACACAGCGCTCGTTGTAAT	ORF UL97		61°C
460_2R_MID1	CTATGCGCCTTGCCA GCCCGCTCAGACGAGTGCGT GACATGCAATAACGCCGTAG	ORF UL97	358 bp	60°C
460_2F_MID1	CGFATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAGACGAGTGCGT TTTTCATCACGACCAAGTGGAA	ORF UL97		60°C
520_1F_MID1	CGFATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAGACGAGTGCGT GCCGACGCTATCAAATTTCT	ORF UL97	331 bp	61°C
520_1R_MID1	CTATGCGCCTTGCCA GCCCGCTCAGACGAGTGCGT AAAAGGCCAGCACGTTACC	ORF UL97		61°C
520_2R_MID1	CTATGCGCCTTGCCA GCCCGCTCAGACGAGTGCGT AGGGCCGTAGCTCATT	ORF UL97	362 bp	59°C
520_2F_MID1	CGFATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAGACGAGTGCGT CCCTATCCGGATTACAACGA	ORF UL97		59°C
600_1F_MID1	CGFATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAGACGAGTGCGT TTAATTGCAATGTCGGAGCTGT	ORF UL97	338 bp	60°C
600_1R_MID1	CTATGCGCCTTGCCA GCCCGCTCAGACGAGTGCGT AACAGACGCTCCACGTTCTT	ORF UL97		60°C
600_2R_MID1	CTATGCGCCTTGCCA GCCCGCTCAGACGAGTGCGT ATACAGCCCGTCGCTCGT	ORF UL97	335 bp	59°C
600_2F_MID1	CGFATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAGACGAGTGCGT GGTAACGTGCTGGGCTTTT	ORF UL97		60°C

**Tab. 3.9 Fusionsprimer zur Amplicon-Sequenzierung (NGS)**

F: forward, R: reverse, MID: multiplex identifier, bp: Basenpaare, Tm: Schmelztemperatur

grün: Adaptersequenz Primer A; orange: Adaptersequenz Primer B; blau: TCAG Schlüsselsequenz zur Amplicon-Sequenzierung; schwarz: MID, Erkennungssequenz; rot: Zielsequenz

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Zielgen	Produktgröße	Tm
460_1F_MID2	CGFATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAGACGCTCGACA GTGCTCACGGTCTGGATGT	ORF UL97	360 bp	61°C
460_1R_MID2	CTATGCGCCTTGCCA GCCCGCTCAGACGCTCGACA CACACAGCGCTCGTTGTAAT	ORF UL97		61°C
460_2R_MID2	CTATGCGCCTTGCCA GCCCGCTCAGACGCTCGACA GACATGCAATAACGCCGTAG	ORF UL97	358 bp	60°C
460_2F_MID2	CGFATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAGACGCTCGACA TTTTCATCACGACCAAGTGGAA	ORF UL97		60°C
520_1F_MID2	CGFATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAGACGCTCGACA GCCGACGCTATCAAATTTCT	ORF UL97	331 bp	61°C
520_1R_MID2	CTATGCGCCTTGCCA GCCCGCTCAGACGCTCGACA AAAAGGCCAGCACGTTACC	ORF UL97		61°C
520_2R_MID2	CTATGCGCCTTGCCA GCCCGCTCAGACGCTCGACA AGGGCCGTAGCTCATT	ORF UL97	362 bp	59°C
520_2F_MID2	CGFATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAGACGCTCGACA CCCTATCCGGATTACAACGA	ORF UL97		59°C
600_1F_MID2	CGFATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAGACGCTCGACA TTAATTGCAATGTCGGAGCTGT	ORF UL97	338 bp	60°C
600_1R_MID2	CTATGCGCCTTGCCA GCCCGCTCAGACGCTCGACA AACAGACGCTCCACGTTCTT	ORF UL97		60°C
600_2R_MID2	CTATGCGCCTTGCCA GCCCGCTCAGACGCTCGACA ATACAGCCCGTCGCTCGT	ORF UL97	335 bp	59°C
600_2F_MID2	CGFATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAGACGCTCGACA GGTAACGTGCTGGGCTTTT	ORF UL97		60°C

**Tab. 3.10 Fusionsprimer zur Amplicon-Sequenzierung (NGS)**

*F: forward, R: reverse, MID: multiplex identifier, bp: Basenpaare, Tm: Schmelztemperatur*

*grün: Adaptersequenz Primer A; orange: Adaptersequenz Primer B; blau: TCAG Schlüsselsequenz zur Amplicon-Sequenzierung; schwarz: MID, Erkennungssequenz; rot: Zielsequenz*

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Zielgen	Produktgröße	Tm
460_1F_MID3	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAGAGCACTCGTGCTCACGGTCTGGATGT	ORF UL 97	360 bp	61°C
460_1R_MID3	CTATGCGCCTTGCCA GCCCGCTCAGAGCACTCCACACAGCGCTCGTTGTAAT	ORF UL 97		61°C
460_2R_MID3	CTATGCGCCTTGCCA GCCCGCTCAGAGCACTCGACATGCAATAACGCCGTAG	ORF UL 97	358 bp	60°C
460_2F_MID3	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAGAGCACTCTTTTCATCACGCCAGTGGAA	ORF UL 97		60°C
520_1F_MID3	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAGAGCACTCGCCGACGCTATCAAA TTTCT	ORF UL 97	331 bp	61°C
520_1R_MID3	CTATGCGCCTTGCCA GCCCGCTCAGAGCACTCAAAAAGCCCA GCA CGTTACC	ORF UL 97		61°C
520_2R_MID3	CTATGCGCCTTGCCA GCCCGCTCAGAGCACTCAGGGCCGTA GCTCATT	ORF UL 97	362 bp	59°C
520_2F_MID3	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAGAGCACTCCCTATCCGGATTACAACGA	ORF UL 97		59°C
600_1F_MID3	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAGAGCACTCTTATTGCA TGTGGAGCTGT	ORF UL 97	338 bp	60°C
600_1R_MID3	CTATGCGCCTTGCCA GCCCGCTCAGAGCACTCAACAGACCGTCCA CGTTCTT	ORF UL 97		60°C
600_2R_MID3	CTATGCGCCTTGCCA GCCCGCTCAGAGCACTCATACAGCCCGTCCGCTCGT	ORF UL 97	335 bp	59°C
600_2F_MID3	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAGAGCACTCGGTAACGTTGCTGGGCTTTT	ORF UL 97		60°C

**Tab. 3.11 Fusionsprimer zur Amplicon-Sequenzierung (NGS)**

*F: forward, R: reverse, MID: multiplex identifier, bp: Basenpaare, Tm: Schmelztemperatur*

*grün: Adaptersequenz Primer A; orange: Adaptersequenz Primer B; blau: TCAG Schlüsselsequenz zur Amplicon-Sequenzierung; schwarz: MID, Erkennungssequenz; rot: Zielsequenz*

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Zielgen	Produktgröße	Tm
460_1F_MID4	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAGAGCACTGTAGGTGCTCACGGTCTGGATGT	ORF UL 97	360 bp	61°C
460_1R_MID4	CTATGCGCCTTGCCA GCCCGCTCAGAGCACTGTAGCACACAGCGCTCGTTGTAAT	ORF UL 97		61°C
460_2R_MID4	CTATGCGCCTTGCCA GCCCGCTCAGAGCACTGTAGGACATGCAATAACGCCGTAG	ORF UL 97	358 bp	60°C
460_2F_MID4	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAGAGCACTGTAGTTTCATCACGCCAGTGGAA	ORF UL 97		60°C
520_1F_MID4	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAGAGCACTGTAGCCGACGCTATCAAA TTTCT	ORF UL 97	331 bp	61°C
520_1R_MID4	CTATGCGCCTTGCCA GCCCGCTCAGAGCACTGTAGAAAAGCCCA GCA CGTTACC	ORF UL 97		61°C
520_2R_MID4	CTATGCGCCTTGCCA GCCCGCTCAGAGCACTGTAGAGGGCCGTA GCTCATT	ORF UL 97	362 bp	59°C
520_2F_MID4	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAGAGCACTGTAGCCCTATCCGGATTACAACGA	ORF UL 97		59°C
600_1F_MID4	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAGAGCACTGTAGTATTGCA TGTGGAGCTGT	ORF UL 97	338 bp	60°C
600_1R_MID4	CTATGCGCCTTGCCA GCCCGCTCAGAGCACTGTAGAACAGACCGTCCA CGTTCTT	ORF UL 97		60°C
600_2R_MID4	CTATGCGCCTTGCCA GCCCGCTCAGAGCACTGTAGATACAGCCCGTCCGCTCGT	ORF UL 97	335 bp	59°C
600_2F_MID4	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA TCAGAGCACTGTAGGTAACGTTGCTGGGCTTTT	ORF UL 97		60°C

**Tab. 3.12 Fusionsprimer zur Amplicon-Sequenzierung (NGS)**

F: forward, R: reverse, MID: multiplex identifier, bp: Basenpaare, Tm: Schmelztemperatur

grün: Adaptersequenz Primer A; orange: Adaptersequenz Primer B; blau: TCAG Schlüsselsequenz zur Amplicon-Sequenzierung; schwarz: MID, Erkennungssequenz; rot: Zielsequenz

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Zielgen	Produktgröße	Tm
460_1F_MID5	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATCAGACACGGTGTCAACGGTCTGGATGT	ORF UL 97	360 bp	61°C
460_1R_MID5	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGATCAGACACGCACACAGCGCTCGTTGTAAT	ORF UL 97		61°C
460_2R_MID5	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGATCAGACACGGACATGCAATAACGCCGTAG	ORF UL 97	358 bp	60°C
460_2F_MID5	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATCAGACACGTTTCATCACGCCAGTGGAA	ORF UL 97		60°C
520_1F_MID5	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATCAGACACGGCCGACGCTATCAAATTCT	ORF UL 97	331 bp	61°C
520_1R_MID5	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGATCAGACACGAAAAGCCAGCACGTTACC	ORF UL 97		61°C
520_2R_MID5	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGATCAGACACGAGGCCCGCTAGCTCATTT	ORF UL 97	362 bp	59°C
520_2F_MID5	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATCAGACACGCCCTATCCGGATTACAACGA	ORF UL 97		59°C
600_1F_MID5	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATCAGACACGTTATTGCAATGTCGGAGCTGT	ORF UL 97	338 bp	60°C
600_1R_MID5	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGATCAGACACGAAACAGACGCTCCACGTTCTT	ORF UL 97		60°C
600_2R_MID5	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGATCAGACACGATACAGCCCGTCCGCTCGT	ORF UL 97	335 bp	59°C
600_2F_MID5	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATCAGACACGGGTAACGTGCTGGGCTTTT	ORF UL 97		60°C

**Tab. 3.13 Fusionsprimer zur Amplicon-Sequenzierung (NGS)**

F: forward, R: reverse, MID: multiplex identifier, bp: Basenpaare, Tm: Schmelztemperatur

grün: Adaptersequenz Primer A; orange: Adaptersequenz Primer B; blau: TCAG Schlüsselsequenz zur Amplicon-Sequenzierung; schwarz: MID, Erkennungssequenz; rot: Zielsequenz

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Zielgen	Produktgröße	Tm
460_1F_MID6	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATATCGCGAGGGTGTCAACGGTCTGGATGT	ORF UL 97	360 bp	61°C
460_1R_MID6	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGATATCGCGAGCACACAGCGCTCGTTGTAAT	ORF UL 97		61°C
460_2R_MID6	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGATATCGCGAGGACATGCAATAACGCCGTAG	ORF UL 97	358 bp	60°C
460_2F_MID6	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATATCGCGAGTTTCATCACGCCAGTGGAA	ORF UL 97		60°C
520_1F_MID6	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATATCGCGAGGCCGACGCTATCAAATTCT	ORF UL 97	331 bp	61°C
520_1R_MID6	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGATATCGCGAGAAAAGCCAGCACGTTACC	ORF UL 97		61°C
520_2R_MID6	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGATATCGCGAGAGGCCCGCTAGCTCATTT	ORF UL 97	362 bp	59°C
520_2F_MID6	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATATCGCGAGGCCCTATCCGGATTACAACGA	ORF UL 97		59°C
600_1F_MID6	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATATCGCGAGTTATTGCAATGTCGGAGCTGT	ORF UL 97	338 bp	60°C
600_1R_MID6	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGATATCGCGAGAACAGACGCTCCACGTTCTT	ORF UL 97		60°C
600_2R_MID6	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGATATCGCGAGATACAGCCCGTCCGCTCGT	ORF UL 97	335 bp	59°C
600_2F_MID6	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATATCGCGAGGGGTAACGTGCTGGGCTTTT	ORF UL 97		60°C

### 3.1.4 Chemikalien

Die in den Kits enthaltenen Chemikalien werden nicht einzeln aufgeführt. Darüber hinaus kamen folgende Chemikalien zum Einsatz:

Chemikalie	Hersteller
Agarose	Invitrogen, Carlsbad/USA
Bidestilliertes Wasser (ddH <sub>2</sub> O)	Fluka, Buchs/CH
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg/D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt/D

Ethanol	Merck, Darmstadt/D
GelRed™	Biotium, Hayward/USA
IPTG	Biomol, Hamburg/D
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Roche Diagnostics, Mannheim/D
Natronlauge (NaOH)	Merck, Darmstadt/D
dNTP-Mix, 10 mM each	Roche Diagnostics, Mannheim/D
Streptavidin-Sepharose	GE Healthcare Biosciences, Uppsala/SE
X-Gal	Invitrogen, Carlsbad/USA

### 3.1.5 Puffer und Lösungen

Puffer/ Lösungen	Hersteller
Annealing Puffer (PSQ)	Biotage, Uppsala/SE
Binding Puffer (PSQ)	Biotage, Uppsala/SE
DNA Probenpuffer 5% Bromphenolblau, 70% Sucrose	Serva, Heidelberg/D
<i>Eco</i> R1 Puffer	New England Biolabs, Beverly/USA
Laufpuffer ( Agarose-Gel) 1xTBE (0,1 M Tris; 0,09 M Natrium-Borat; 0,001 M EDTA)	Invitrogen, Carlsbad/USA
Waschpuffer (PSQ)	Biotage, Uppsala/SE
10x PCR-Puffer	Applied Biosystems, Foster City/USA
Ethanol Lösung 70%	Merck, Darmstadt/D
LB-Agar 17g/l Bacto-Agar in LB-Flüssigmedium	Haus-interne Herstellung im Robert-Koch-Institut
LB-Flüssigmedium 10g/l Bacto-Trypton; 5g/l Bacto-Yeast-Extrakt; 10g/l NaCl pH 7,5 sterilfiltriert	Haus-interne Herstellung im Robert-Koch-Institut
Natronlauge 0,2 M	Merck, Darmstadt/D
SOC-Medium	Invitrogen, Carlsbad/USA

### 3.1.6 Enzyme, DNA-Marker und Vektoren

Enzym/ DNA-Marker/ Vektor	Hersteller
<i>Eco</i> R1	New England Biolabs, Beverly/USA
AmpliTaQ Gold DNA-Polymerase	Applied Biosystems, Foster City/USA
Platinum Taq DNA-Polymerase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe/D

λ DNA-HindIII Digest	New England Biolabs, Beverly/USA
λ DNA-BstEII Digest	New England Biolabs, Beverly/USA
100 bp DNA ladder	New England Biolabs, Beverly/USA
1kbp DNA ladder	New England Biolabs, Beverly/USA
pCR®2.1 - TOPO®	Invitrogen GmbH, Karlsruhe/D

### 3.1.7 Reagenziensets (Kits)

Reagenzienset	Hersteller
AmpliTaq Gold™	Applied Biosystems, Foster City/USA
GS FLX Titanium emPCR Kit (Lib-A)	Roche Life Science, Branford/USA
GS FLX Titanium Sequencing Kit XLR70	Roche Life Science, Branford/USA
Invisorb Spin PCRapid Kit	Invitek, Berlin/D
Pyro Gold Reagents (5x96 PyroMark™ ID)	Biotage, Uppsala/SE
QIAprep Miniprep Kit	Quiagen, Valencia/USA
QIAquick PCR Purification Kit	Quiagen, Valencia/USA
TOPO TA Cloning® Kit-pCR® 2.1TOPO®	Invitrogen GmbH, Karlsruhe/D

### 3.1.8 Software

Software	Hersteller
ABI PRISM™ DNA Sequencing Analyzer	Applied Biosystems, Foster City/USA
Auto Assembler 2.1.	Applied Biosystems, Foster City/USA
BLASTN	NCBI, USA
EditSeq	DNASTAR, Inc., Madison/USA
Geneious	Biomatters Ltd., Auckland/New Zealand
GS Amplicon Variant Analyzer (AVA)	Roche Life Sciences, Branford/USA
Lasergene® SeqBuilder™	DNASTAR, Inc., Madison/USA
Lasergene® SeqMan Pro™	DNASTAR, Inc., Madison/USA
MacVector™8.1.1	International Biotech., Inc., USA
Microsoft Office 2010	Microsoft Corp., Redmond/USA
Mutation resistance analyzer (Ulmer Resistenzdatenbank)	<a href="http://www.informatik.uni-ulm.de/ni/mitarbeiter/HKestler/hcmv/">http://www.informatik.uni-ulm.de/ni/mitarbeiter/HKestler/hcmv/</a>
MXPro V 4.0	Stratagene, La Jolla/USA
Nanodrop	PeqLab, Erlangen/D
PyroMark™ID System Biotage	Biotage, Uppsala/SE

### 3.1.9 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät/ Verbrauchsmaterial	Hersteller
ABI PRISM™ 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Foster City/USA
Analysenwaage	Sartorius, Göttingen/D
Fotodokumentationssystem	INTAS, Göttingen/D
Fresco 21 Zentrifuge	Heraeus, Osterode/D
Flat cap strips	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham/USA
Gefrierschränke	Heraeus, Osterode/D
Gelelektrophoresekammer	Biometra, Göttingen/D
Glaswaren	Brand, Wertheim/D; Schott AG, Mainz/D
Heizblock	Techne, Staffordshire/UK
Kryogefäße	Nunc, Roskilde/DK
Kühlschränke	Bosch, Stuttgart/D
Labofuge 400	Heraeus, Osterode/D
Magnetrührer	IKA-Werk, Stauffen im Breisgau/D
Mastercycler® ep	Eppendorf, Hamburg/D
Mikrowelle	Sharp Electronics Corp., USA
Mikrozentrifuge	Labnet, USA
NanoDrop Spektrophotometer	PeqLab, Erlangen/D
PCR-96-Lochplatten	Applied Biosystems, Foster City/USA; Abgene, Epsom/UK
PCR-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg/D
Petrischalen	PeqLab, Erlangen/D
Pipetten	Eppendorf, Hamburg/D; Gilson, Columbus/USA
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht/D
Plastikküvetten	Sarstedt, Nümbrecht/D
PSQ™-96-Lochplatten	Biotage, Uppsala/SE
PyroMark ID-Pyrosequenziergerät	Biotage, Uppsala/SE
PyroMark Vakuum Prep Workstation	Biotage, Uppsala/SE
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg/D
Roche 454 GS FLX+	Roche Life Sciences, Branford/USA
Spannungsgeräte	Biometra, Göttingen/D
Stratagene MX3000P™-Cycler	Stratagene, La Jolla/USA
Thermocycler	Biometra, Göttingen/D
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg/D
Tischzentrifuge	Heraeus, Osterode/D
UV-Handlampe	Novodirekt, Karlsruhe/D

Vortex	IKA-Werk, Stauffen im Breisgau/D
Wasserbad	Haake, Karlsruhe/D

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 DNA-Extraktion

Die Extraktion der DNA aus den Proben erfolgte größtenteils durch das Fachpersonal des virologischen Instituts der Charité. Vereinzelt wurden Nativpräparate mit Hilfe des *Qiagen-DNeasy Blood & Tissue Kits* extrahiert. Dabei werden die Zellen nach den Vorgaben des Herstellerprotokolls zunächst mit 20 µl Proteinase K lysiert. Anschließend werden die Proben mit 4 µl RNase A (110 mg/ml) versetzt und zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl AL-Puffer erfolgt ein weiterer Inkubationsschritt bei 70°C und 900 Umdrehungen im Thermoschüttler. Im folgenden Schritt wird der Ansatz mit 200 µl Ethanol (100%) versetzt und das Gemisch auf die DNeasy Mini Säule pipettiert. Während einer erneuten Zentrifugation (1 min, 8000 rpm) bindet die DNA an die Membran der Säule, der Überstand wird verworfen. Es folgen zwei Waschschriffe unter Zuhilfenahme von 500 µl AW-1-Puffer und Zentrifugation (1 min., 8000 rpm) sowie 500 µl AW-2-Puffer und Zentrifugation (3 min., 13.000 rpm). Im Anschluss erfolgt die Elution der DNA durch Zugabe von 200 µl AE-Puffer, welcher zuvor auf 70°C erwärmt wurde. Nach einer letzten Zentrifugation (80 sek., 8000 rpm) kann die Säule verworfen und die extrahierte DNA weiter verwendet werden.

### 3.2.2 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (*engl. Polymerase chain reaction, PCR*) ermöglicht die gezielte Amplifikation eines DNA-Abschnittes aus Probenmaterial unter Verwendung sequenzspezifischer Primer. Diese Oligonukleotide werden so gewählt, dass sie komplementär vor dem gewünschten Amplifikationsabschnitt binden und diesen so flankieren. Neben der Vervielfältigung kann die PCR ebenso als Nachweisverfahren für das Vorhandensein des gesuchten DNA Abschnittes eingesetzt werden.

Der Reaktionsablauf der PCR erfolgt in 30-45 Zyklen nach einem dreiphasigen Standardprogramm. Im ersten Schritt, der Denaturierung, werden zunächst die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden DNA-Strängen des Templates gespalten. Dies geschieht durch Erhitzen auf 94-96°C. Anschließend erfolgt die sequenzspezifische Anlagerung der beiden PCR-Primer (sense/antisense) an den jeweils passenden Einzelstrang. Die optimale Temperatur wird hierbei durch Länge und Sequenz des Primers bestimmt und liegt in

der Regel zwischen 55-65°C. Im letzten Schritt schließt sich die eigentliche Vervielfältigung des gewählten DNA-Abschnittes durch die Polymerase an. Mit Hilfe der im Reaktionsgemisch enthaltenen Nukleotide synthetisiert diese bei 72°C den komplementären DNA-Strang. Am Ende des Reaktionszyklus liegen nun zwei doppelsträngige DNA-Moleküle vor, die sich mit jedem weiteren Zyklus exponentiell vermehren.

Der gesamte Prozess findet in einem programmierbaren *Thermocycler* der Firma *Eppendorf* bzw. *Biometra* statt und kann den Anforderungen unterschiedlicher Templates im Hinblick auf die optimale Ausbeute und Spezifität des PCR-Produktes entsprechend variiert werden.

Als synthetisierendes Enzym findet die „*hot start*“ DNA-Polymerase Anwendung. Dieses, aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* stammende, kurz auch als Taq-Polymerase bezeichnete Enzym ist thermostabil und liegt als „*hot start*“-Variante bei Raumtemperatur inaktiv vor. Initial bedarf es daher einer minutenlangen Temperaturerhöhung auf 94-96 °C, wodurch der Reaktionsbeginn im *Thermocycler* gezielt gesteuert werden kann.

Das in der vorliegenden Arbeit für die Erzeugung von PCR-Produkten verwendete Reaktionsprotokoll ist in Tabelle 3.14 dargestellt, eine Auflistung der im Reaktionsansatz enthaltenen Reagenzien findet sich in Tabelle 3.15.

**Tab. 3.14 Cyclo-Einstellungen für die konventionelle PCR**

\*: *Primer- Hybridisierungstemperatur entspricht den Schmelztemperaturen der entsprechenden Primer;*

×: *Elongationsdauer abhängig von der Länge des zu generierenden Amplifikats*

PCR-Phase	Temperatur in °C	Dauer in Sekunden	Zyklenzahl
Initialisierung	95	720	1
Denaturierung	95	20	45
Primer-Hybridisierung	*	30	
Elongation	72	×	
Reaktionsstopp	4	∞	1

**Tab. 3.15 Reaktionsansatz für die konventionelle PCR**

DNA: desoxyribonucleic acid; NTP: Nukleosidtriphosphat; DMSO: Dimethylsulfoxid

Reagenz	Endkonzentration	Volumen in $\mu\text{l}$ pro 25 $\mu\text{l}$ Reaktionsansatz
DNA-Template	300 ng/Ansatz	X
dNTP-Mix, 10 mM je NTP	200 $\mu\text{M}$	0,5
10 $\times$ Puffer (ohne $\text{MgCl}_2$ )	1 $\times$	2,5
$\text{MgCl}_2$ , 25 mM	2 mM	2
Primer (sense/antisense), 10 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	2,5
DMSO	5%	1,25
AmpliTaq-Gold-Polymerase	1 U	0,2
ddH <sub>2</sub> O	-	x (ad 25)
Gesamtvolumen	-	25

### 3.2.3 Long-Distance PCR

Um besonders lange DNA-Fragmente, wie den ORF UL54, mit Hilfe der PCR-Technik amplifizieren zu können, findet die sogenannte Long-Distance PCR Anwendung. Der Ablauf entspricht einer konventionellen PCR, jedoch müssen einige Parameter an die Anforderungen des langen Templates angepasst werden.

Da die Taq-Polymerase zwar eine hohe Prozessivität aufweist, es jedoch unter ihrer Verwendung häufig zu Fehlhybridisierungen kommt, wird bei der Long-Distance PCR auf ein speziell optimiertes Enzymgemisch aus Taq-Polymerase und einer Polymerase mit 3'-5' Exonuklease-Eigenschaft, wie beispielsweise *Pfu*, zurück gegriffen. Diese aus dem Bakterium *Pyrococcus furiosus* stammende und ebenfalls thermostabile Polymerase zeichnet sich durch ihre zuverlässige Proofreading-Aktivität aus, weist allerdings eine geringere Prozessivität als die Taq-Polymerase auf.

Zudem sollen sorgfältig ausgewählte Primer, angepasste Pufferbedingungen und geringere Denaturierungs- und Elongationstemperaturen Schäden am DNA-Fragment verhindern.

**Tabelle 3.16 Cyclex-Einstellungen für die Long-Distance PCR**

\*: Primer- Hybridisierungstemperatur entspricht den Schmelztemperaturen der entsprechenden Primer

PCR-Phase	Temperatur in °C	Dauer in Sekunden	Zykluszahl
Initialisierung	94	300	1
Denaturierung	98	20	15
Primer-Hybridisierung	*	30	
Elongation	70	280	
Zwischenelongation	72	1800	1
Denaturierung	98	20	15
Primer-Hybridisierung	*	30	
Elongation	70	285	
Reaktionsstopp	16	∞	1

**Tab. 3.17 Reaktionsansatz für die Long-Distance PCR, Pipettiervorgang auf Eis**

DNA: desoxyribonucleic acid; NTP: Nukleosidtriphosphat;

Reagenz	Endkonzentration	Volumen in µl pro 50 µl Reaktionsansatz 1.Runde	Volumen in µl pro 50 µl Reaktionsansatz 2.Runde
DNA-Template	150-500 ng/Ansatz	10,0	1,0
dNTP-Mix, 2,5 mM je NTP	400 µM	8,0	8,0
10 × ExTaq Puffer (mit MgCl <sub>2</sub> )	1 ×	5,0	5,0
Primer (s/as), 10 µM	2 x 400 nM	2 x 2,0	2 x 2,0
ExTaq Enzym-Mix	5 U	0,5	0,5
ddH <sub>2</sub> O	-	x (ad 50)	x (ad 50)
Gesamtvolumen	-	50	50

### 3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zum Nachweis der Amplifikate sowie der Auftrennung verschieden großer DNA-Fragmente wurde im Anschluss an die PCR eine Gelelektrophorese mit *GelRed* (0,05 µl/ml) versetzter Agarose durchgeführt. Hierbei macht man sich das Prinzip der Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld zunutze.

Die als Trägermaterial eingesetzte Agarose bildet je nach eingesetzter Konzentration unterschiedlich große Poren. Wird Spannung angelegt, wandern die negativ geladenen DNA-Moleküle durch diese zur Anode. Die Laufstrecke der linearen DNA-Fragmente ist dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Länge, d.h. je kleiner die Fragmente, desto weiter ist ihre Laufstrecke im Gel. Moleküle ähnlicher Größe sammeln sich in Banden, die mit Hilfe des in die DNA interkalierenden *GelReds* unter UV-Licht (254 nm – 366 nm) sichtbar gemacht werden. Die Länge der Fragmente kann durch Vergleich ihrer Laufstrecke mit der eines mitgeführten Standards bestimmt werden.

Als Laufpuffer dient 1×TBE-Puffer. Nach initialer Präparation der PCR-Produkte mit 2/5 Vol DNA-Ladepuffer, laufen diese bei 70-90 Volt etwa 40-50 Minuten durch das Gel. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Gele mit Konzentration von 0,8-1,5 % Agarose verwendet.

### 3.2.5 Aufreinigung von PCR-Produkten

Um mit den erhaltenen Amplifikaten weiterarbeiten zu können, schließt sich der PCR ein Reinigungsschritt an, in dem überschüssige Reagenzien, wie Primer, nicht eingebaute Nukleotide, Salze oder Enzyme aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden. Dies ist notwendig, da jegliche Verunreinigungen anschließende Prozesse, wie Sequenzierung oder Klonierung empfindlich stören können. Die Aufreinigung erfolgt mit dem *Invisorb Spin PCRapid Kit* der Firma *Invitec*. Mit Hilfe eines Silica-Membran-Säulensystems kann dabei sowohl einzel- als auch doppelsträngige DNA von den übrigen Bestandteilen getrennt werden. Dabei wird in einem ersten Schritt 130 µl PB Puffer zum PCR-Produkt gegeben und auf die Silica-Membran übertragen. Die anschließende Zentrifugation ermöglicht dabei die Bindung der amplifizierten DNA-Fragmente an die Membran. Der Überstand wird verworfen. Im nächsten Schritt sorgt die Zugabe von 700 µl eines ethanolhaltigen Waschpuffers dafür, dass störende Substanzen in einem erneuten Zentrifugationsschritt weggewaschen werden. Um überschüssiges Ethanol zu entfernen wird anschließend noch einmal zentrifugiert. Im letzten Schritt erfolgt die Elution durch Applikation von 20 µl ddH<sub>2</sub>O, welches zuvor im Wasserbad auf 50°C erhitzt wurde.

### 3.2.6 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

Viele weitere Arbeitsschritte machen die Bestimmung der DNA-Konzentration des PCR-Produkts erforderlich. Anhand der Bandenintensität der Agarose-Gelelektrophorese kann eine erste orientierende Abschätzung des DNA-Gehalts durch den Vergleich zur Markerbande erfolgen. Exaktere Werte lassen sich allerdings durch photometrische Konzentrationsmessung mit Hilfe des *NanoDrop<sup>®</sup>N 1000* Spectrophotometers bestimmen. Dafür werden 2 µl des aufgereinigten PCR-Produktes zwischen zwei Glasfaseroptikkabel pipettiert und deren Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 230 nm gemessen. Nach vorheriger Null-Kalibrierung unter Verwendung von 2 µl Wasser bzw. Puffer berechnet das Gerät den jeweiligen DNA-Gehalt.

### 3.2.7 Kopienzahlberechnung

Zum Erstellen des Plasmid-Standards für die Auswertung der in der Real-time PCR vermessenen Proben war die Kenntnis der genauen Kopienzahl essentiell. Bei bekannter Probenkonzentration in ng/µl, ließ sich deren Kopienzahl/µl mit Hilfe einer Formel berechnen, wie in folgender Beispielrechnung gezeigt ist.

Die Umrechnung von µg dsDNA in pmol dsDNA:

$$\text{Stoffmenge}_{dsDNA} [\text{pmol}] = \text{Masse}_{dsDNA} [\text{g}] * 1515 / \text{Länge}_{dsDNA} [\text{bp}]$$

Somit enthält **1µg dsDNA** mit einer Länge von **1000bp**

$$\text{Stoffmenge}_{dsDNA} [\text{pmol}] = 1 [\mu\text{g}] * 1515 / 1000 [\text{bp}] = 1,52 \text{ pmol}$$

Unter Verwendung der **Avogadro-Konstante NA**, die die Teilchenzahl/Stoffmenge angibt

$$NA = 6,022 * 10^{23} [\text{Teilchen bzw. Kopien}] / [\text{mol}] = 6,022 * 10^{11} [\text{Kopien}] / [\text{pmol}]$$

enthält **1µg dsDNA** also folgende **Kopienzahl**

$$\text{Kopienzahl}_{1\mu\text{g}dsDNA} = 6,022 * 10^{11} [\text{Kopien}] / [\text{pmol}] * 1,52 [\text{pmol}] / [\mu\text{g}]$$

### 3.2.8 DNA-Sequenzierung mittels Didesoxymethode nach Sanger

Bei der Didesoxymethode nach Sanger handelt es sich um ein auf einer in-vitro-Replikation eines DNA-Fragmentes beruhenden Verfahrens zur DNA-Sequenzierung. Zwei markierte Oligonukleotid-Primer (sense und antisense) binden an einen bereits bekannten Sequenzbereich des aufgereinigten PCR-Produktes, von dem ausgehend die Polymerase den komplementären

DNA-Strang synthetisiert. Dabei befinden sich im Reaktionsansatz neben Desoxynukleotiden (dNTP's) mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Didesoxynukleotide (ddNTP's), die mit den dNTP's um den Einbau im synthetisierenden Strang konkurrieren. Da den ddNTP's am 3'-Ende die Hydroxygruppe fehlt, kommt es bei deren Einbau zum Kettenabbruch, der nach dem Zufallsprinzip an verschiedenen Stellen stattfindet. So entstehen Sequenzprodukte unterschiedlicher Länge, die im Anschluss mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Entsprechend des spezifischen Fluoreszenzsignals kann nun das zuletzt eingebaute Nukleotid identifiziert und die zum PCR-Produkt komplementäre Sequenz anhand der Bandenfolge abgelesen werden.

Für die Sequenzierungen der im Rahmen dieser Arbeit erstellten PCR-Produkte fand das *ABI PRISM™ BigDye-Terminator-Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* Anwendung. Tabelle 3.18 zeigt die Zusammensetzung der Ansätze für die Sequenzierungsreaktion.

**Tab. 3.18 Reaktionsansatz für die Sequenzierungs-PCR**

*\*abhängig von Fragmentgröße und Zustandsform (linear/zirkulär)*

Reagenz	Volumen in µl pro Reaktionsansatz
DNA-Template (3-300ng*)	X
BigDye-Premix	1
5 x Puffer	1,5
Primer (10µM)	0,8
ddH <sub>2</sub> O	x (ad 10)
Gesamtvolumen	10

Der Sequenzierungsprozess erfolgte im *Thermocycler*, dessen Einstellungen Tabelle 3.19 zu entnehmen sind.

**Tab. 3.19 Cyclor-Einstellungen für die Sequenzierungsreaktion**

*\*Primer-Hybridisierungstemperatur entspricht den Schmelztemperaturen der verwendeten Primer*

PCR-Phase	Temperatur in °C	Dauer in Sekunden	Zyklenzahl
Initialisierung	90	150	1
Denaturierung	96	10	25
Primer-Hybridisierung	*	5	
Elongation	60	240	
Reaktionsstopp	4	∞	1

Die sich anschließende Analyse der Sequenzen wurde im Sequenzierlabor des Robert Koch Instituts mittels des *ABI PRISM 3100 Genetic Analyzers* vorgenommen. Dieser regt mit Hilfe eines Argon-Lasers die mit dem Fluoreszenzfarbstoff markierten Nukleotide an. Ein Detektor registriert deren Lichtsignal.

### 3.2.9 Pyrosequenzierung

#### 3.2.9.1 Prinzip

Die Pyrosequenzierung (PSQ) basiert auf dem Prinzip *sequencing-by-synthesis*. Dabei wird während des Strangaufbaus an dNTPs gebundenes Pyrophosphat abgespalten und in einem Enzym-Substrat-System in ein zu detektierendes Lichtsignal umgewandelt. Bei bekannter Nukleotid-Dispensionsreihenfolge gibt das entstehende Lichtsignal Aufschluss über die zugrundeliegende Sequenz.

Im ersten Schritt bindet der spezifische Sequenzierprimer an den zu analysierenden DNA-Strang. Mit dem anschließenden Einbau der komplementären Base durch die Polymerase wird Pyrophosphat freigesetzt, welches neben dem im Reaktionssystem enthaltenen Adenosinphosphosulfat als Substrat für die ATP-Sulfonylase dient. Diese setzt beide Reaktionspartner zu Adenosintriphosphat (ATP) um. Mit Hilfe des ATPs kann nun Luciferin durch die katalysierende Wirkung der Luciferase zu Oxyluciferin umgewandelt werden. Dies geschieht unter Emission eines Lichtquanten, der durch eine CCD-Kamera im Pyrosequenziergerät detektiert und in Form eines Pyrogramms graphisch dargestellt werden kann. Dabei bedingt die Anzahl der eingebauten Nukleotide die Höhe des Lichtintensitätsausschlages.

Um einen störungsfreien Ablauf zu garantieren, werden überschüssige Nukleotide, die nicht in den Strang eingebaut werden konnten, von der Apyrase abgebaut.

Bei der Durchführung der Pyrosequenzierung werden zwei Analyse-Modi unterschieden. In Abhängigkeit von der zu treffenden Aussage und dem Wissen über die zu analysierende Sequenz stehen zum einen der sogenannte *sequence analysing* Modus (SQA) und zum anderen der *single nucleotide polymorphism* (SNP) Modus zur Verfügung. Bei ersterem kann eine unbekannte Sequenzabfolge mit einer Reichweite von etwa 100bp ermittelt werden, indem alle vier Nukleotide nacheinander mit definierter Zyklenzahl eingespritzt werden. Ist die komplementäre Base gefunden entsteht im Pyrogramm ein Peak an entsprechender Stelle. Im SNP Modus wird die Dispensationsreihenfolge dagegen mit Hilfe zuvor festgelegter Entrys an die bekannte Basensequenz angepasst. Lediglich an der Stelle des zu erwartenden Polymorphismus erfolgt eine Mehrfacheinspritzung der entsprechenden Nukleotide. Um Störsignale erkennen zu können werden zudem sogenannte Kontrollbasen in die Dispensationsreihenfolge eingebaut, welche an entsprechender Stelle nicht in der Zielsequenz vorkommen und somit nicht zu einem Peak im Pyrogramm führen sollten. Die Anwendung des SNP Modus empfiehlt sich, wenn der Fokus auf der Analyse einzelner Basen mit bekannter Nachbarsequenz liegt und eine Genotypisierung vorgenommen werden soll. Von Vorteil ist dieser Modus daher auch bei der Diskriminierung zwischen Wildtyp- und Mutantenvirus, wenn diese sich durch entsprechende Punktmutationen voneinander unterscheiden. Anhand der Position des Peaks im Pyrogramm können beide Virustypen einfach differenziert werden. Zudem ist über die Integration der Peakflächen auch bei dem Vorkommen beider oder sogar multipler Polymorphismen in einer Probe eine Quantifizierung der jeweiligen Mengenverhältnisse zueinander möglich.

### **3.2.9.2 Durchführung**

Bevor mit der Pyrosequenzierung begonnen werden konnte, mussten mittels konventioneller PCR zunächst unter Verwendung biotinylierter Primer Amplifikate der zu sequenzierenden DNA-Abschnitte hergestellt werden. Die Biotinylierung ermöglicht dabei die spätere Separation des Doppelstrangs in die für die Sequenzierung notwendigen Einzelstränge. Dies geschieht durch Bindung des Biotins an Sepharose, wobei man sich die hohe Affinität der beiden Bindungspartner zunutze macht.

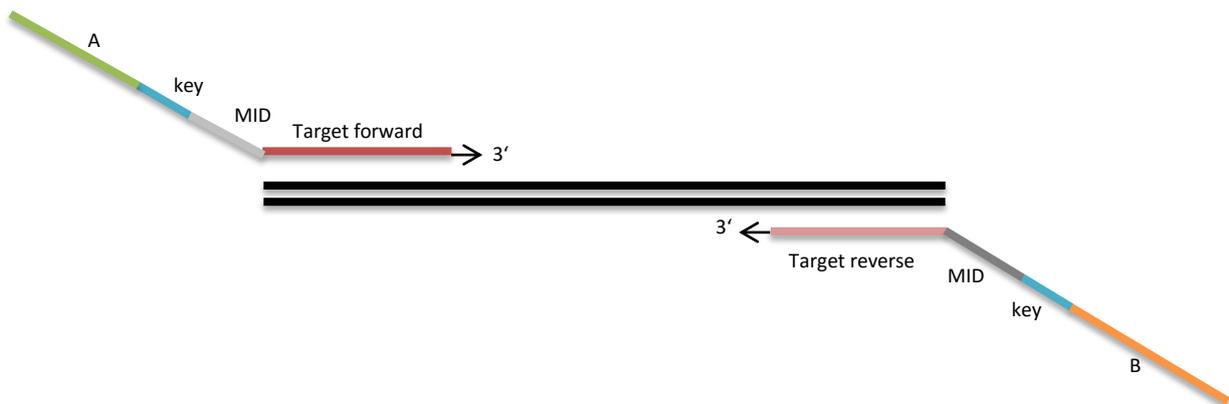
Um eine Diskriminierung zwischen Wildtyp- und Mutantenvirus vornehmen zu können lief die Pyrosequenzierung im Rahmen dieser Arbeit im SNP-Modus.

Die umfassende Mutationsanalyse des ORF UL97 erfolgte mit Hilfe dreier verschiedener PSQ-Assays, die es zulassen sollten möglichst viele der bekannten Resistenz-assoziierten Punktmutationen trotz ihrer Distanz zueinander zu detektieren. Als Ausgangsmaterial für die Sequenzanalyse dienten dabei Fragmente einer Länge zwischen 69 und 107 bp. Anders als bei der Sanger-Sequenzierung war eine Aufreinigung der Amplifikate im Anschluss an die PCR nicht erforderlich, da dies im Rahmen der Probenpräparation vor der Pyrosequenzierung erfolgte. In einem ersten Schritt wurden dazu in einer *96-well*-PCR-Platte zunächst pro Ansatz 20 µl Probe mit 40 µl Binding Puffer, 4 µl Sepharose und 16 µl H<sub>2</sub>O versetzt und anschließend für fünf Minuten bei 1400 rpm auf einer Schüttelplattform inkubiert. Dies begünstigt die Bindung des biotinylierten PCR-Produkts an die Sepharose. Anschließend wurden die vorbehandelten Proben unter Verwendung der sogenannten *Pyromark Vakuum Prep Workstation, Biotage/Uppsala SE* mit 70 % Ethanol, 0,1 mM NaOH und Waschlösung denaturiert und gewaschen. Primerreste, sowie der nicht biotinylierte DNA-Strang wurden somit aus dem Sequenzieransatz entfernt. Zuvor wurde die optisch durchlässige PSQ-Platte mit 40 µl Annealing-Puffer und 1,5-3 µl (abhängig vom jeweiligen Assay) Sequenzierprimer (10 µM) beladen, um anschließend die gewaschenen und denaturierten Proben in diese zu überführen. Die Anlagerung der Primer an die DNA-Fragmente erfolgte durch zweiminütige Inkubation bei 80°C im Sandbad. In der Zwischenzeit wurde der Enzym- und Substratmix, sowie die Nukleotide dATP, dGTP, dTTP und dCTP in den den Entwürfen entsprechenden Mengen in ein Kartuschensystem gegeben. Nach Einsetzen der Kartusche und der Sequenzierplatte in das *PyroMark ID-Pyrosequenziergerät* konnte die Reaktion gestartet werden. Die anschließende Auswertung der Sequenzierergebnisse erfolgte Software-gestützt mittels *PyroMark™ID System Biotage* in Form von Pyrogrammen.

### **3.2.10 Next Generation Sequencing (NGS)**

Grundlage der modernen Sequenzierungsmethoden bildet die Separation und klonale Amplifikation von Einzelmolekülen mit Hilfe von Streptavidin oder auch Styrofoam Kügelchen (beads) im Rahmen einer sogenannten Emulsions-PCR. Dazu werden im ersten Schritt geeignete Fusionsprimer entworfen, welche in einer konventionellen PCR die Amplifikate mit Adaptersequenzen versehen. Diese bestehen aus etwa 20-25 bp einer Target-spezifischen Bindungs- und einer 19 bp langen festen Adaptersequenz, die am 5'Ende des Templates binden. Zudem wird jedem Patienten eine Erkennungssequenz (MID bei Roche) zugeordnet. Die Adaptersequenzen erlauben zum einen die spätere Bindung des amplifizierten Moleküls an die beads und dienen zum anderen als Primer für die Sequenzierungsreaktion. Dabei werden zwei

Adaptersequenzen, A und B, unterschieden. Abbildung 3.1 zeigt den schematischen Aufbau der Fusionsprimer.



**Abb. 3.1 graphische Darstellung des DNA-Doppelstranges mit anliegenden Fusionsprimern**

[Modifiziert nach [http://www.metabion.com/products/454ngs\\_prices.php](http://www.metabion.com/products/454ngs_prices.php)]

A: Adaptersequenz A, B: Adaptersequenz B, key: Schlüsselsequenz TCAG, MID (multiplex identifier): Erkennungssequenz, Target forward: Zielsequenz vorwärts, Target reverse: Zielsequenz rückwärts

In einem weiteren Schritt erfolgt die Aufreinigung und Quantifizierung der PCR-Produkte. Hier kann auf verschiedene Methoden zurückgegriffen werden.

Es folgt die Erstellung einer sogenannten library, in der die Amplifikate in äquimolaren Mengen zusammengefasst werden und anschließend der Emulsions-PCR zugeführt werden können. Hierbei erfolgt in einer Wasser-Öl-Emulsion die Immobilisation der DNA-Fragmente an den Streptavidin Kügelchen über die Bindung der Adaptersequenz A jedes Einzelmoleküls an die zu ihr komplementären Oligonukleotide der beads. Adapter B dient nun als Ausgangssequenz für die DNA-Polymerase. Die Bindung an die beads, die jeweils separat in einem Tröpfchen der Emulsion erfolgt, ermöglicht so die klonale Amplifikation jedes Einzelragments. Die angewandte Detektionstechnik der sich anschließenden Sequenzierungsreaktion unterscheidet sich je nach Hersteller. Bei dem 454 Sequencer von Life Science/Roche werden die beladenen beads auf eine Picotiterplatte übertragen, auf der etwa 1 Millionen wells zur Verfügung stehen, die so konfiguriert sind, dass jeweils 1 bead pro well Platz findet. Die eigentliche Sequenzierungsreaktion, basierend auf dem Prinzip der Pyrosequenzierung, erfolgt als „sequencing by synthesis“ in Echtzeit. Nacheinander erfolgt die Zugabe der Nukleotide A, T, C und G, deren Einbau in den neu synthetisierten DNA-Strang über eine Kette von enzymatisch katalysierten Reaktionen zu einem Lichtsignal führt, welches durch eine CCD Kamera registriert

wird. Wie bei der klassischen Pyrosequenzierung gibt auch hier die Stärke des jeweiligen Lichtsignals Aufschluss über die Anzahl der eingebauten Nukleotide.

### **3.2.11 Klonierung mit TOPO-TA**

Ziel der Klonierung ist das Einbringen eines spezifischen DNA Fragments (Insert) in einen Vektor und die anschließende klonale Vermehrung des rekombinanten Vektors in transformierten Bakterienzellen. Da jede Zelle dabei nur ein Vektormolekül aufnimmt, kann die DNA so vereinzelt werden. Die Klonierung wurde mit dem *TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing* durchgeführt. Als Vektor diente der im Kit enthaltene *2.1-TOPO®-Vektor*.

#### **3.2.11.1 Herstellung rekombinanter Plasmide**

Bei der Ligation des PCR-Produktes mit dem *2.1-TOPO®-Vektor* macht man sich die Transferaseaktivität der Taq-Polymerase für die Konstruktion des Poly-A-Überhangs zunutze. Im Anschluss an die PCR erfolgt daher eine 15-minütige Inkubation des Amplifikats mit 4,5 µL Stocksolution und 0,5 µL Taq-Polymerase (AmpliTaq gold) bei 72°C im *Thermocycler*. Die Polymerase fügt am 3'-Ende des PCR-Produktes einen Desoxyadenosintriphosphat-Überhang an. Dieser Poly-A-Überhang am Insert bindet anschließend komplementär an einen Desoxythymidintriphosphatrest am 3'-Ende des *TOPO®-Vektors*. 4 µl des Amplifikats werden dazu mit 1 µl Salzlösung sowie 1 µl Vektor versetzt und für 30 Minuten bei 22°C inkubiert. Die Bindung der beiden Liganden wird dabei durch die an den Vektor gebundene Topoisomerase I unterstützt. Dieses, ursprünglich aus dem Vaccinia-Virus stammende Enzym, ist in aktivierter Form am nichtligierten Vektor über Tyr274 mit dem überhängenden Thymin verbunden. Bei Zugabe eines PCR-Produktes mit Poly-A-Überhang wird die Topoisomerase unter Ausbildung einer Phosphodiesterbindung vom Vektor verdrängt. In der Zwischenzeit wurden die bei -80°C gelagerten kompetenten E.coli-Zellen (*OneShot®TOP10*) auf Eis aufgetaut. Diese speziellen Zellen sind chemisch so vorbehandelt, dass ihre Membran durchlässiger wird und somit eine verbesserte Transformationskapazität erreicht wird. Durch Zufügen von 2 µl des Ligationsansatzes wird die Transformation eingeleitet. Während der folgenden 30 Minuten auf Eis präzipitiert die DNA aufgrund der in der Salzlösung enthaltenen Ca<sup>2+</sup>-Ionen mikrokristallin auf der Zelloberfläche. Im Anschluss daran werden die Zellen 30 sec lang einem Hitzeschock (42°C) ausgesetzt und anschließend abrupt auf Eis abgekühlt. Im Zuge dessen wird die DNA passiv in die Wirtszellen aufgenommen. Zur Regeneration der transformierten Zellen werden diese anschließend mit 250 µl SOC-Medium versetzt und bei 37°C inkubiert. Nach einer Stunde folgt das Ausplattieren der Zellen im 50 µl- und 100 µl-Ansatz auf vorbereitete

Selektivnährböden und die anschließende Lagerung bei 37°C im Brutschrank. Die Nährböden, bestehend aus *lysogeny-broth medium* (LB-Medium), wurden zuvor mit 1 µl Ampicillin versetzt. Zudem werden die Platten, bevor die Zellen darauf ausplattiert werden können, mit jeweils 30 µl X-Gal und 10 µl IPTG behandelt, um später eine Blau-Weiß-Selektion der gewachsenen Bakterienkolonien zu ermöglichen. Dies ist notwendig, um Kolonien, welche das Insert tragen, von denen, bei denen das Plasmid kein Insert trägt, zu unterscheiden. Das Prinzip dieser Selektion beruht auf der Unterbrechung des *lacZ*-Gens durch das Einbringen des Inserts in den kodierenden Bereich des Plasmids. Dieses Gen kodiert das N-terminale  $\alpha$ -Fragment der  $\beta$ -Galactosidase. In Anwesenheit von Galaktose oder eines Galaktose-Derivates wie IPTG kann dieses zunächst inaktive Fragment synthetisiert werden. Führt man es nun mit dem C-terminalen  $\beta$ -Fragment der Galactosidase zusammen, das die *OneShot®TOP10*-Zellen exprimieren, wird die  $\beta$ -Galactosidase aktiviert und spaltet das als Substrat zugegebene X-Gal. Dadurch entsteht 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid, welches in Gegenwart von Sauerstoff zu einem indigoblauen Farbstoff dimerisiert. Ist das *lacZ*-Gen jedoch durch die Aufnahme des Inserts unterbrochen worden, kommt es aufgrund des fehlenden  $\alpha$ -Fragments zu keiner Aktivierung der  $\beta$ -Galactosidase und somit auch nicht zum Farbumschlag. Rekombinante Kolonien bleiben weiß und lassen sich optisch leicht von den blauen Kolonien, die kein PCR-Produkt als Insert tragen, unterscheiden.

Als weiterer Selektionsfaktor bei der Klonierung dient zudem die Ampicillinresistenz Vektor-tragender Bakterienzellen. Da dieses Gen ebenfalls auf dem Plasmid lokalisiert ist, jedoch durch das Einbringen des Inserts nicht unterbrochen wird, können nur Vektor tragenden Zellen auf den Ampicillin-haltigen Nährböden wachsen.

Nach etwa 16 stündiger Inkubation im Brutschrank werden die weißen Kolonien mittels Impfüse aufgenommen und in 4-5 ml mit Ampicillin versetztes LB-Flüssigmedium überführt. Die Kultivierung erfolgt über 12 Stunden bei 37°C auf dem Schüttler (200 rpm). Im Anschluss können die Plasmide aus den Flüssigkulturen isoliert werden.

### **3.2.11.2 Isolierung von Plasmid-DNA (Miniprep)**

Die Extraktion und Aufreinigung der Plasmid-DNA aus der Bakterienkultur erfolgte mit Hilfe des *QIAprep Spin Miniprep Kits* von *Qiagen*. Initial wurden dazu in zwei aufeinanderfolgenden Schritten je 2 µl der Bakteriensuspension bei Raumtemperatur zentrifugiert (10.000 rpm, 10 min), um die Zellen in Pellets zu konzentrieren. Es folgte eine Resuspension dieser mit 250 µl Puffer P1. Dieser enthält unter anderem RNase und den Komplexbildner

Ethylendiamintetraessigsäure EDTA, welcher durch die Bindung an Magnesiumionen der bakteriellen Zellwand, die Integrität dieser empfindlich stört und zudem DNA-abbauende Enzyme hemmt. Die RNase trägt ferner zur Degradation bakterieller DNA bei. Im nächsten Schritt erfolgte die alkalische Lyse der Zellen durch Zugabe von 250 µl Puffer P2. Darin enthaltenes Sodiumdodecylsulfat (SDS) führt zum Abbau von Phospholipiden und Proteinen der bakteriellen Zellmembran, wodurch die im Plasma liegenden Zellkomponenten in den Überstand freigesetzt werden. Natronlauge (NaOH) denaturiert zudem die chromosomale DNA. Im Anschluss wurde der Ansatz mit 350 µl Neutralisationspuffer N3 versetzt und anschließend zentrifugiert (13.000 rpm, 10 min). Restliche bakterielle Abbauprodukte präzipitieren dadurch zum einen als Salz-Detergenz-Komplexe. Zum anderen wird das alkalische Lysat neutralisiert und eine nachfolgende Isolierung der Plasmid-DNA auf einem Säulensystem ermöglicht. Hierzu wurde der Reaktionsansatz mit der darin enthaltenen Plasmid-DNA auf eine Silica-Membran übertragen und zur Förderung der Adsorption an die Membran mit 500 µl Bindungspuffer (BP) versetzt und zentrifugiert (10.000 rpm, 1 min). Durch Applikation von 750 µL ethanolhaltigem Waschpuffer (PE-Puffer) wurden noch vorhandene Proteine und Metabolite entfernt, bevor die Plasmid-DNA in einem abschließenden Schritt mit 50 µl ddH<sub>2</sub>O von der Säulenmembran eluiert werden konnte. Im Anschluss konnte die Konzentration der aufgereinigten DNA am *NanoDrop® N 1000* photometrisch bestimmt werden.

### **3.2.11.3 Restriktionsverdau**

Der Erfolg der Klonierung kann im Anschluss an die Isolierung der Plasmid-DNA durch enzymatische Spaltung dieser mittels Restriktionsendonukleasen überprüft werden. Diese Enzyme bakterieller Herkunft erkennen fremde DNA und degradieren diese, schneiden also durch hydrolytische Spaltung der Phosphodiesterbindungen das Insert aus dem Plasmid. Um dabei den Abbau zelleigener DNA zu verhindern ist diese innerhalb der palindromischen Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen methyliert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für den Restriktionsverdau das Enzym *EcoRI* verwendet. Dazu wurden 4 µl Plasmid-DNA mit 1 U *EcoRI*, 1 µl *EcoRI*-Puffer und 1 µl 10 x Rinderserumalbumin (BSA) versetzt und mit ddH<sub>2</sub>O auf 20 µl aufgefüllt. Dabei gilt ein U (Unit) als die Enzymmenge, die bei 37°C unter idealen Reaktionsbedingungen innerhalb einer Stunde 1 µg Lambda-Phagen-DNA schneiden kann. Nach Ansetzen des Reaktionsgemisches folgte eine Inkubationszeit von 20 Minuten bei 37°C im Thermoschüttler, während der *EcoRI* das Insert an der sogenannten *multiple cloning site* (MCS) aus dem Vektor herausschneidet. Bei der anschließenden

Gelelektrophorese wurden Insert und Vektor der Größe nach aufgetrennt. Bei erfolgreicher Klonierung entsteht im Agarosegel ein charakteristisches Bandenmuster, wobei das Insert mit einer Länge von 729 bp weiter läuft als der Vektor mit einer Größe von etwa 4000 bp.

Nach erfolgtem Nachweis der Integration des Inserts in den Vektor durch den Restriktionsverdau, wurde das Insert zudem mittels Sequenzanalyse nach Sanger (siehe Kapitel 2.2.8) überprüft.

## **4 Ergebnisse**

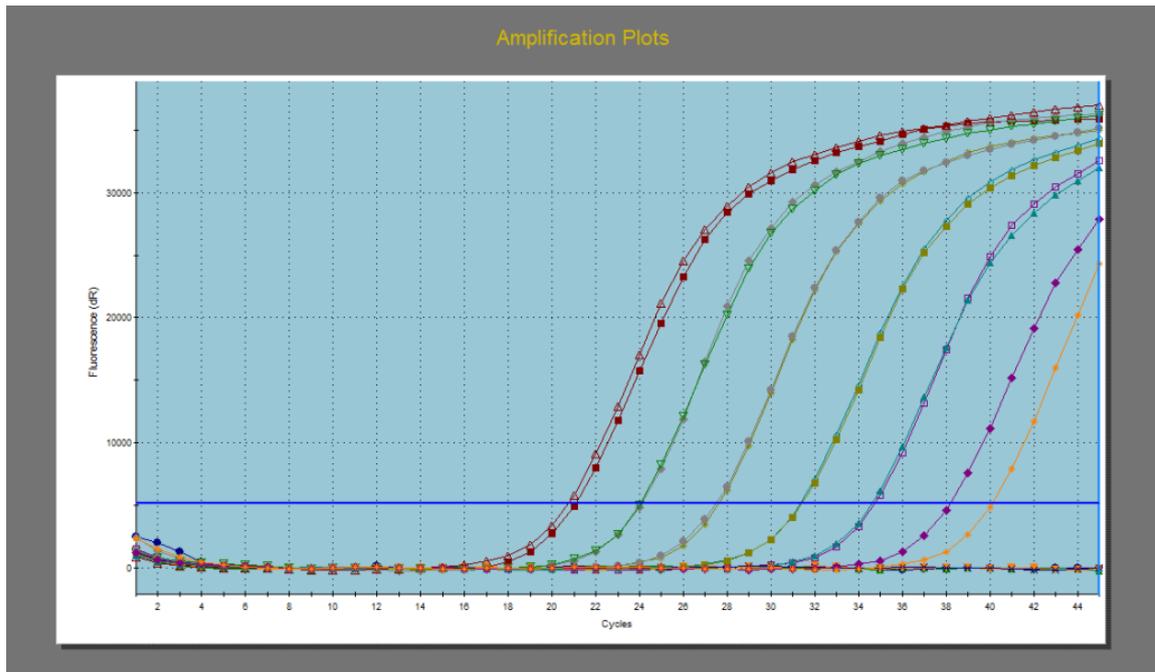
### **4.1 Versuchsablauf**

Zur Evaluierung verschiedener Sequenziermethoden zum Nachweis GCV-resistenter HCMV-Stämme in mischinfiziertem Patientenmaterial wurden uns vom virologischen Institut der Charité Berlin Patientenproben zur Verfügung gestellt, bei denen im zeitlichen Verlauf trotz antiviraler Therapie kein Rückgang der Viruslast zu verzeichnen war. Nach Extraktion der DNA erfolgte die Amplifikation nach PCR-Protokollen, die auf das entsprechende Verfahren zur anschließenden Sequenzierung des ORFs UL97 abgestimmt wurden. Die PCR-Produkte wurden nach Sanger, sowie mit Hilfe der PSQ sequenziert, um GCV-Resistenz-assoziierte Punktmutationen im ORF UL97 zu detektieren und zu quantifizieren. Wurden bei Patienten mehrere Mutationsstellen in einer Probe gefunden, wurden einzelne dieser Proben kloniert, um das Auftreten einer Doppelmutante von einer Mischung mutierter HCMV-Stämme unterscheiden zu können. Das Ergebnis der Klonierung wurde anschließend mit den Ergebnissen der Sequenzierungen verglichen. Zudem wurden zur Bestimmung der Viruslasten alle Proben mittels Real-time PCR amplifiziert und die Ergebnisse mit den Kopienzahlen, soweit vorhanden, aus der *LightCycler*-Bestimmung der Charité gegenübergestellt. Proben, bei denen hohe Viruslasten gefunden wurden, wurden nach Durchführung einer dreistufigen Long-Distance-PCR mit Hilfe der Sanger-Sequenzierung auf Mutationen im ORF UL54 untersucht. Im Anschluss wurden vereinzelte Proben, die sowohl in der Sanger-Sequenzierung als auch in der PSQ Punktmutationen im ORF UL97 aufwiesen, mit dem neuen Verfahren der Genomsequenzierung, speziell der Amplicon-Sequenzierung analysiert.

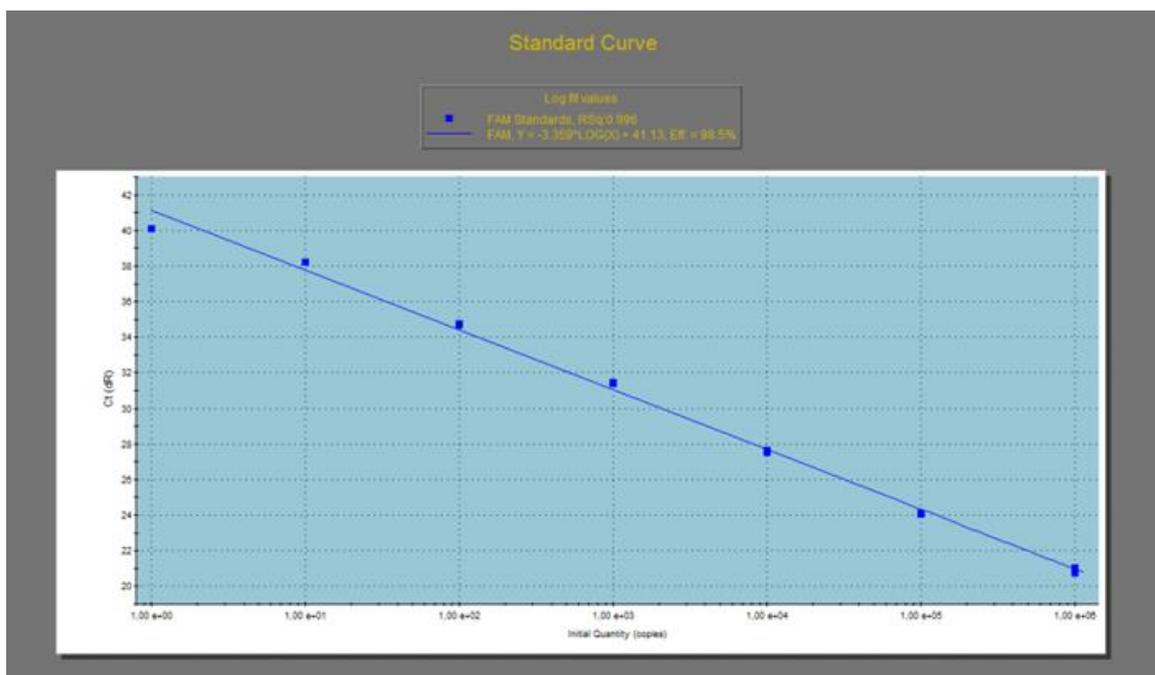
### **4.2 Kopienzahlbestimmung mittels Real-time PCR**

Alle in der PSQ analysierten Patientenproben wurden mit Hilfe der Real-time PCR *TaqMan* hinsichtlich ihrer HCMV-Genomkopienzahlen quantifiziert. Hierbei erfolgt die Bestimmung der Amplifikatzunahme in Echtzeit. Ein mitgeführter Plasmidstandard erlaubt Rückschlüsse auf die Genomkopienzahlen im Ansatz. Abbildung 4.1. zeigt beispielhaft das in Abhängigkeit der Zyklenzahl zunehmende Fluoreszenzsignal im Standard, sowie die daraus ermittelte Standardgerade. Insgesamt wurden dazu sieben Verdünnungsstufen eines UL97-tragenden Plasmids mit definierter Kopienzahl/Ansatz verwendet.

a)



b)



**Abb. 4.1 Standardreihe a) und daraus resultierende Regressionsgerade b) der Verdünnungsstufen 100-106 einer Verdünnungsreihe für die TaqMan-PCR**

*In Abb. a) ist die Fluoreszenz gegenüber der Zyklenzahl aufgetragen, woraus sich die Standardkurven für die einzelnen Verdünnungsstufen definierter Kopienzahl/Ansatz ergeben.*

*In Abb. b) ist der Ct-Wert gegenüber der Kopienzahl aufgetragen*

Die Zunahme des Fluoreszenzsignals während der Amplifikation ist in den Kurven in Abb. 4.1.a dargestellt. Dabei entspricht jede Kurve einer Verdünnungsstufe. Idealerweise sollten diese den

gleichen Anstieg haben, sowie den gleichen Abstand zueinander und im Plateau die gleiche Fluoreszenzintensität besitzen. Abbildung 4.1.b zeigt die daraus resultierende Regressions- oder Standardgerade. Hierbei geben, korrelierend zur Kopienzahl, die Punkte der Gerade den ermittelten Ct-Wert an. Anhand des Ct-Wertes wird deutlich, ab welchem Amplifikationszyklus ein signifikantes Fluoreszenzsignal messbar wird, d.h. wie sensitiv der Genomkopiennachweis im angewandten Assay ist. Die Sensitivität dieses PCR-Assays liegt bei etwa 10 Kopien/Ansatz, d.h. bei 2 Kopien/ $\mu\text{l}$  eingesetzter Probe.

Die Real-time PCR wurde in Doppelbestimmung zu je 25  $\mu\text{l}$  Reaktionsansätzen (enthält je 5  $\mu\text{l}$  Probe) durchgeführt. Die Ergebnisberechnung erfolgte mit Hilfe der Ct-Mittelwerte. Tabelle 4.1 zeigt einen Überblick über das untersuchte Patientenmaterial und die darin ermittelten HCMV-Genomkopienzahlen mittels TaqMan.

**Tab. 4.1** Probennummern mit Zuordnung zum Patienten und der mittels TaqMan ermittelten Kopienzahl/ml.

Patient	Proben-Nr.	Kopien/ml									
1	hu 3513	16.840	5	hu 3565	4.940	7	hu 3521	0	11	hu 3975	neg.
	hu 3514	23.820		hu 3566	8.240		hu 3522	0		hu 3976	neg.
	hu 3516	900		hu 3567	4.180		hu 3523	0		hu 3977	neg.
	hu 3517	1.800		hu 3568	6.720		hu 3524	0		hu 3978	neg.
	hu 3518	500		hu 3569	6.160		hu 3525	0		hu 3979	1.144.700
hu 3520	0	hu 3570		6.700	hu 3526		760	hu 3980		4.147.800	
2	hu 3587	0		hu 3571	7.020		hu 3527	4.420		hu 3981	1.596.580
	hu 3588	8.500		hu 3572	6.740		hu 3528	5.300		hu 3982	468.140
	hu 3589	29.900		hu 3573	7.720		hu 3529	2.880		hu 3983	29.640
	hu 3590	1.156.640		hu 3574	4.980		hu 3530	2.960		hu 3984	2.420
	hu 3591	340		hu 3575	5.460		hu 3531	114.540		hu 3985	1.080
	hu 3593	676.240		hu 3576	4.680		hu 3532	1.223.520		hu 3986	0
	hu 3595	2.146.440		hu 3577	9.880		hu 3533	916.180		hu 3987	0
3	hu 3673	0		hu 3578	5.380		hu 3534	71.840		hu 3988	820
	hu 3674	0		hu 3579	239.520		hu 3535	4.320		hu 3989	1.340
	hu 3675	neg.	hu 3580	318.080	hu 3536	6.420	hu 3990	0			
	hu 3676	960	hu 3581	142.440	hu 3537	8.360	hu 3991	neg.			
	hu 3677	9.140	hu 3582	73.660	hu 3538	5.040	hu 3992	200			
	hu 3678	5.500	hu 3583	77.700	hu 3540	6.120	hu 3993	0			
	hu 3679	4.840	hu 3584	63.780	hu 3541	8.020	hu 3994	0			
	hu 3680	2.520	hu 3585	36.100	hu 3542	80.940	hu 3995	1.140			
	hu 3681	5.600	hu 3586	10.040	hu 3543	67.820	hu 3996	27.380			
	hu 3682	5.380	hu 3596	-	hu 3544	96.280	hu 3997	16.660			
	hu 3683	1.740	hu 3597	-	hu 3546	33.300	hu 3998	2.060			
	hu 3684	2.480	hu 3598	0	hu 3547	19.780	hu 3999	0			
	hu 3685	4.920	hu 3599	0	hu 3549	9.620	hu 4000	0			
	hu 3686	9.720	hu 3601	0	hu 3550	9.600	hu 4001	0			
	hu 3687	17.540	hu 3602	0	hu 3948	3.200	hu 4002	23.980			
	hu 3688	14.380	hu 3603	0	hu 3949	160	hu 4003	82.620			
	hu 3689	45.560	hu 3604	0	hu 3712	0	hu 4004	118.380			
	hu 3965	4.560	hu 3605	0	hu 3713	0	hu 3960	4.340			
	hu 3966	15.320	hu 3606	0	hu 3714	20.480	hu 3961	320			
	hu 3967	2.080	hu 3607	236	hu 3715	63.240					
hu 3968	80	hu 3608	2.260	hu 3716	93.320						
hu 3969	neg.	hu 3609	24.940	hu 3717	55.180						
4	hu 3551	0	hu 3610	19.100	hu 3718	63.040					
	hu 3552	0	hu 3611	9.380	hu 3719	26.900					
	hu 3553	0	hu 3612	36.580	hu 3827	14.340					
	hu 3554	0	hu 3613	73.040	hu 3828	10.240					
	hu 3555	0	hu 3614	4.620	hu 3829	2.860					
	hu 3556	0	hu 3615	13.120	hu 3830	0					
	hu 3557	2.560	hu 3616	1.480	hu 3831	8.580					
	hu 3558	0	hu 3618	1.140	hu 3832	780					
	hu 3559	3.120	hu 3619	neg.	hu 3962	neg.					
	hu 3560	6.920	hu 3620	0	hu 3963	32.340					
	hu 3561	0			hu 3964	87.640					
hu 3562	12.480			hu 4159	0						
hu 3563	0			hu 3970	neg.						
hu 3564	3.180			hu 3971	140						
				hu 3972	7.620						
				hu 3973	160						
				hu 3974	0						

neg. PCR negativ

### 4.3 Pyrosequenzierung UL97

Nach der Extraktion der DNA wurden gezielt Fragmente der in den Patientenproben enthaltenen Virus-DNA, die die häufigsten bekannten Positionen Resistenz-assoziiertes UL97 Mutationen enthalten, mit Hilfe spezifischer Primer amplifiziert und anschließend der Pyrosequenzierung zugeführt. Im Vorfeld dieser Arbeit waren hierzu PCR- und Pyrosequenzier-Assays entwickelt und auf ihre Sensitivität bei einer Annealing-Temperatur von 61°C getestet worden. Dabei konnte für alle verwendeten Primer in den Assays eine Nachweisgrenze von 1 Kopie/Ansatz ermittelt werden (B. Schindele, L. Apelt). Unter Verwendung der in Tabelle 4.2 aufgeführten Assays wurden die entsprechenden SNP-Positionen in allen 180 Proben analysiert. Die Durchführung erfolgte wie in Kapitel 2.2.9.2. beschrieben.

**Tab. 4.2 Dispensationsreihenfolge der PSQ-Assays 1-3 und die zugehörigen Codonpositionen mit SNPs**

*SNP: single nucleotide polymorphism, PSQ: Pyrosequenzierung; A: Adenin; C: Cytosin; G: Guanin; T: Thymin*

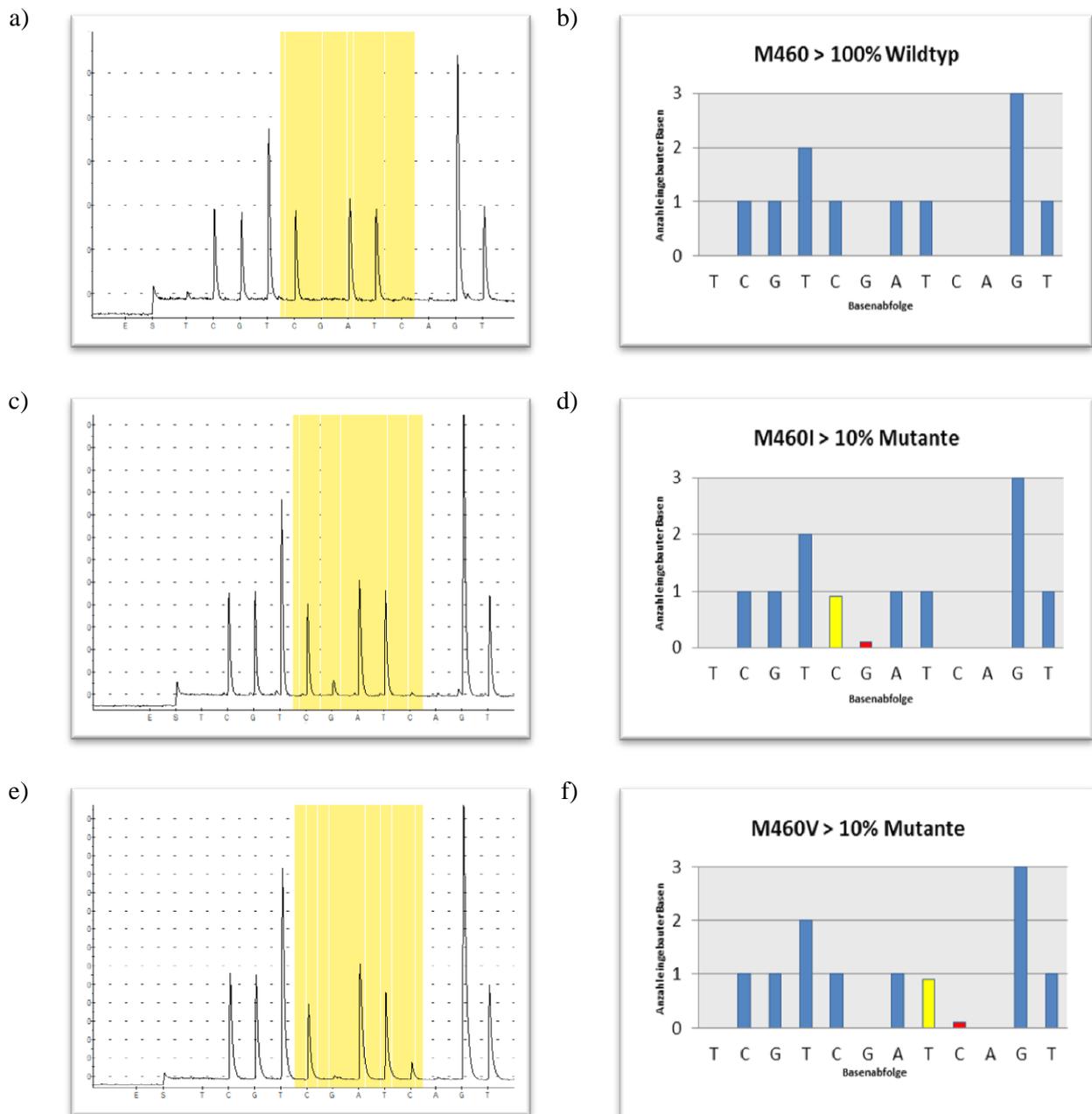
*\* Die Dispensationsreihenfolge ist komplementiert und revertiert zur Zielsequenz des ORF UL97. Die Entries sind um die eingeklammerten Kontrollbasen ergänzt. Diese dienen als interne Kontrolle für das Auftreten von Störsignalen.*

PSQ-Assay (Zielcodon)	PSQ-Primer	Entry*	Mutation	SNP Variation (WT > Mutante)	Aminosäure- Änderung
1 (460)	4289 as	(T)CGTCGATC(A)GT	M460I	ATG > ATC	Methionin > Isoleucin
				ATG > ATT	
			M460V	ATG > GTG	Methionin > Valin
2 (520)	4295 as	(A)GC(A)TG	H520Q	CAC > CAG	Histidin > Glutamin
3 (592-607)	4436 as	(C)GACT(C)AGCG(A)TCGAGC(T)AGTGCGTGA GCTGACT(C)GTCTCAGAC(T)GACGCGCACG	C592G	TGC > GGC	Cystein > Glycin
			A594V	GCG > GTG	Alanin > Valin
			L595S	TTG > TCG	Leucin > Serin
			C603W	TGC > TGG	Cystein > Tryptophan
			D605E	GAC > GAG	Asparagin > Glutamat
			C607Y	TGT > TAT	Cystein > Tyrosin

Da für die Sequenzierung ausschließlich *antisense*-Primer verwendet wurden, müssen die erhaltenen Sequenzen zur Auswertung revertiert und komplementiert werden.

#### 4.3.1 PSQ mit Assay 1

Mit der durchgeführten PCR für Assay 1 konnten von 180 Proben 144 (80%) erfolgreich amplifiziert werden. Der für die anschließende Pyrosequenzierung verwendete Assay 1 erfasst die drei häufigsten Resistenz-assoziierten Mutationen im Codon 460, wobei zwei der Mutationen dieselbe Änderung der Aminosäuresequenz zur Folge haben. Abbildung 4.2. zeigt beispielhaft Pyrogramme mit verschiedenen in Assay 1 ermittelten Mutantenanteilen in mischinfiziertem Patientenmaterial sowie das aus ihnen abgeleitete Histogramm.



**Abb. 4.2 Pyrogramme und Histogramme des PSQ-Assay 1**

a) und b) Pyro- und Histogramm des Assay 1 bei 100% Wildtyp im Ansatz mit der Sequenz C GTT CAT GGG T

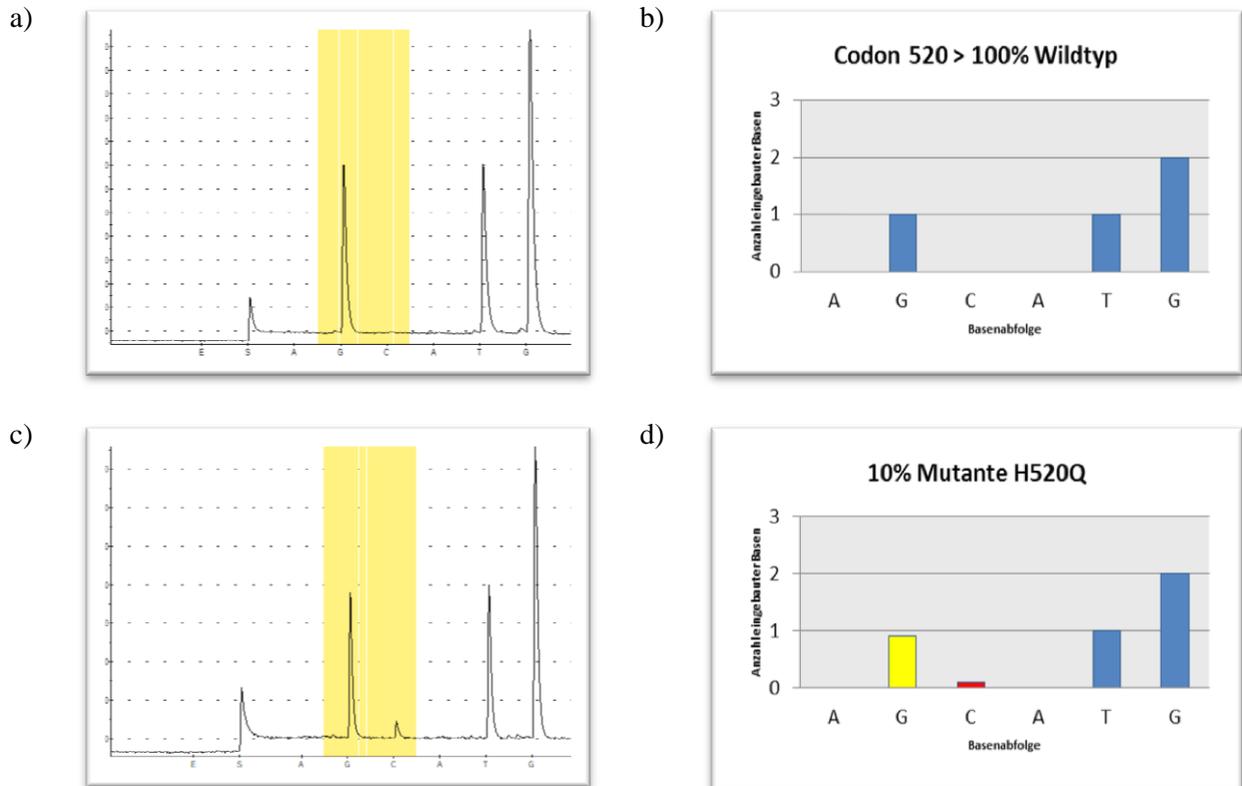
c) und d) Pyro- und Histogramm des Assay 1 bei 10% Anteil der Mutante M460I im Ansatz mit der Sequenz C GTT **GAT** GGG T

e) und f) Pyro- und Histogramm des Assay 1 bei 10% Anteil der Mutante M460V im Ansatz mit der Sequenz C GTT **CAC** GGG T

gelb hinterlegter Bereich: Position der SNPs; roter Balken: zusätzlicher Peak aufgrund der Mutation; gelber Balken: Verminderung des Wildtyp-Peaks aufgrund des Vorliegens einer Mischpopulation

### 4.3.2 PSQ mit Assay 2

Mit Hilfe von Assay 2 wurde das Mutationsvorkommen in Codon 520 analysiert. Mit Hilfe der vorgeschalteten PCR konnten 150 von 180 Proben erfolgreich amplifiziert werden (83%).



**Abb. 4.3 Pyrogramme und Histogramme des PSQ-Assay 2**

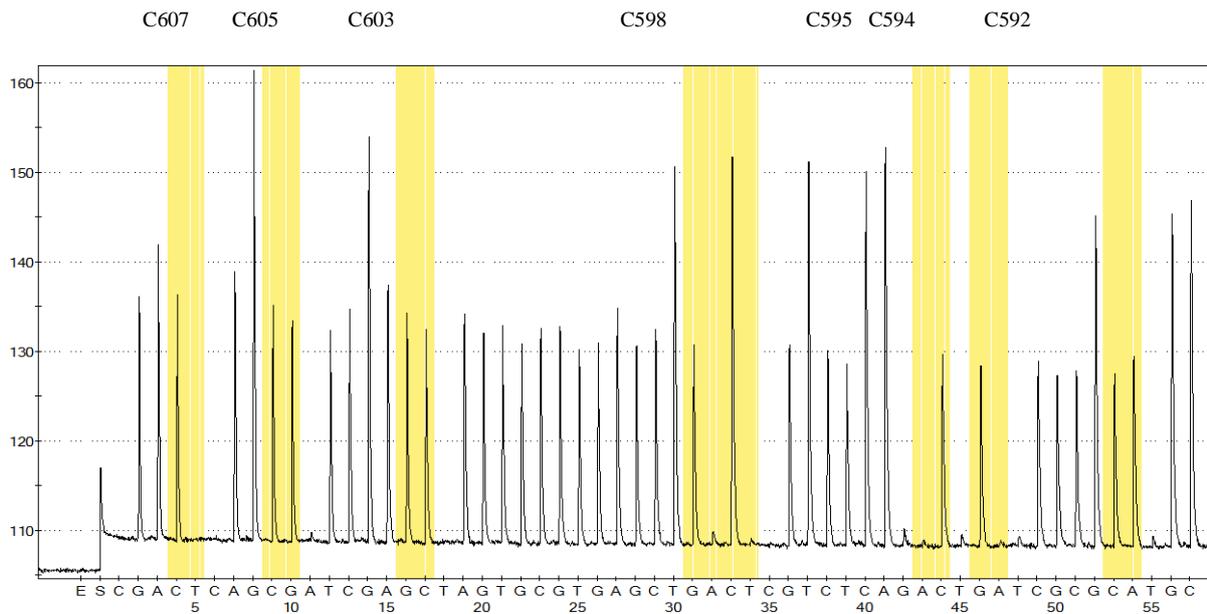
a) und b) Pyro- und Histogramm des Assay 2 bei 100% Wildtyp im Ansatz mit der Sequenz: GTG G

c) und d) Pyro- und Histogramm des Assay 2 bei 10% Mutantenanteil H520Q mit der Sequenz: CTG G

gelb hinterlegter Bereich: Position der SNP; roter Balken: zusätzlicher Peak aufgrund der Mutation; gelber Balken: Verminderung des Wildtyp-Peaks aufgrund des Vorliegens einer Mischpopulation

### 4.3.3 PSQ mit Assay 3

Assay 3 umfasst die Analyse der Codons 592 bis 607, wobei Resistenz-assoziierte Mutationen insbesondere für die Codons 592, 594, 595, 603 und 607 vorbeschrieben sind (Chou 2008). Zudem erfasst der Assay einen häufigen Polymorphismus in Codon 598, sowie die Mutation D605E, der bei gemeinsamem Auftreten mit der seltenen Mutation A594P eine GCV-Resistenzmildernde Wirkung zugeschrieben wird (Ijichi et al 2002). Mit einer Dispensationslänge von 55 Nukleotiden ist dieser Assay der längste in dieser Versuchsreihe. Von den untersuchten 180 konnten in der vorgeschalteten PCR 147 Proben (81,7%) erfolgreich amplifiziert werden.



**Abb. 4.4 Pyrogrammbeispiel des PSQ-Assay 3**

*gelb hinterlegter Bereich: Position der SNPs*

Wildtyp-Sequenz: G ACA GGC GTC GGA GCA GTG CGT GAG CTT GCC GTT CTC CAA CGC  
                   607      605      603                                  598                  595 594  
 GCG GCA GGC C  
           592

Mit Hilfe von wt/mut-Mischungen rekombinanter Plasmide erfolgte im Vorfeld dieser Arbeit für die verwendeten PSQ-Assays die Bestimmung der Nachweisgrenzen (NWG) für Mutationsanteile in Mischpopulation. Dabei lag die NWG für Assay 1 bei 4%, für Assay 2 waren es 3% und für Assay 3 bei 6%. Für alle drei wurde pauschal eine Nachweisgrenze von 6% angesetzt (B. Schindele 2010). Das heißt, in Mischpopulation ist der in den untersuchten Positionen mutierte Virusstamm dann vom Hintergrund abgrenzbar, wenn sein Anteil über 6% des im Reaktionsansatz enthaltenen Virusgenoms ausmacht. Dieser steigt allerdings in Abhängigkeit von der eingesetzten Gesamtkopienzahl im Ansatz. Ausgehend von einer für die TaqMan ermittelten Sensitivität von 10 Kopien im Ansatz (2 Kopien/ $\mu$ l) ist für die Detektion eines Mutantenanteils von 6% einer HCMV-Mischpopulation mittels PSQ eine Gesamtkopienzahl von 167 Kopien/Ansatz erforderlich. Ist die Viruslast im untersuchten Material geringer, steigt damit rechnerisch die Nachweisgrenze.

#### 4.3.4 Pyrosequenzierung der Patientenproben

Insgesamt wurden 180 Proben von 13 Patienten analysiert, bei denen im zeitlichen Verlauf der antiviralen Therapie kein oder ein nur vorübergehender Rückgang der Viruslast erzielt werden

konnte. Alle diesen Proben wurden zunächst einer der Pyrosequenzierung vorangehenden PCR zugeführt. Dabei konnten 159 Proben erfolgreich amplifiziert werden. Im Anschluss erfolgte die Pyrosequenzierung der Amplifikate unter Verwendung aller drei o.g. Assays.

#### 4.3.4.1 Patient 1

Patient 1 erhielt eine HLA-identische Stammzelltransplantation, in deren Vorbereitung der Spender positiv auf HCMV getestet wurde. Patient 1 war seronegativ. Nachdem sich an Tag 15 nach Transplantation erstmals HCMV-DNA im Blut des Patienten nachweisen ließ (*LightCycler* Messung der Charité), wurde die antivirale Therapie in Standarddosis von 2 x 5mg/kg KG Ganciclovir i.v. an Tag 16 nach TX präemptiv begonnen. Hierunter fiel die Viruslast im Blut des Patienten nur diskontinuierlich ab. Von Patient 1 wurden insgesamt sechs Proben, die im zeitlichen Verlauf von acht Wochen gewonnen wurden, auf Aminosäureveränderungen in allen mit Assay 1-3 erfassbaren Mutationspositionen untersucht. In keiner der sequenzierten Proben konnte mit Hilfe der Pyrosequenzierung eine Resistenz-assoziierte Mutation nachgewiesen werden. Klinisch konnte nach erfolgreicher Reduktion der Viruslast die Therapie ab Tag 72 nach TX oral mit Valganciclovir fortgesetzt werden.

**Tab. 4.3 Mittels Pyrosequenzierung nachgewiesene Mutantenanteile in mischinfiziertem Patientenmaterial geordnet nach dem Entnahmetag nach Transplantation (TX) und im jeweiligen Assay erfasster Punktmutation**

Patient	Probe	Tag nach TX	Assay 1		Assay 2	Assay 3					
			M460I	M460V	H520Q	C592G	A594V	L595S	C603W	D605E	C607Y
1	hu 3513	22	2,0%	3,1%	3,9%	3,6%	2,4%	4,8%	0%	3,1%	1,8%
	hu 3514	30	3,2%	0%	3,3%	4,6%	2,4%	3,4%	1,2%	4,3%	0%
	hu 3516	37	2,0%	0%	0%	4,6%	0%	3,3%	3,9%	1,8%	0%
	hu 3517	43	1,9%	0%	4,4%	3,6%	0%	0%	0%	3,0%	0%
	hu 3518	46	failed	failed	failed	3,9%	0%	4,2%	2,7%	1,4%	0%
	hu 3520	80	failed	failed	failed	3,2%	0%	0%	4,9%	5,1%	0%

failed keine Sequenz erhalten

Mutantenanteil bis 6%, unterhalb der PSQ-Nachweisgrenze

#### 4.3.4.2 Patient 2

Patient 2 erhielt eine periphere Stammzelltransplantation eines nicht verwandten HLA-7/10-kompatiblen Spenders. Sowohl Spender, als auch Empfänger wurden im Vorfeld positiv auf HCMV-DNA getestet. Im Verlauf von drei Monaten wurden Patient 2 sieben Blutproben entnommen und auf das Vorhandensein von im ORF UL97 mutierten HCMV-Stämmen untersucht. Dabei wurde nach der Transplantation erstmals in der Probe hu 3588 von Tag 9 nach TX HCMV-DNA mittels quantitativer PCR im Blut des Patienten nachgewiesen. Daraufhin

erfolgte an Tag 13 nach TX die erste Gabe von Ganciclovir präemptiv. Dennoch stieg die Viruslast im Probenmaterial kontinuierlich an, so dass die Therapie an Tag 31 nach TX um Foscavir erweitert wurde. Sieben Tage später erreichte die Viruslast ein Maximum von über zwei Millionen Kopien/ml Blut. Bei der Analyse der Proben mittels Pyrosequenzierung ließ sich ein im Codon 605 mutierter Virusstamm nachweisen, bei dem es sich laut Literatur nicht um eine Resistenz-assoziierte Mutation handelt. Vereinzelt zeigten sich zudem die Mutationen M460V, C592G, A594V und L595S, jeweils mit Mutantenanteilen unter 10% bei jedoch erheblicher Viruslast. Bis auf Probe hu 3591, bei der es sich um eine Urinprobe handelt, wurde hierbei Patienten-Plasma untersucht.

**Tab. 4.4 Mittels Pyrosequenzierung nachgewiesene Mutantenanteile in mischinfiziertem Patientenmaterial geordnet nach dem Entnahmetag nach Transplantation (TX) und im jeweiligen Assay erfasster Punktmutation**

Patient	Probe	Tag vor/nach TX	Assay 1		Assay 2	Assay 3					
			M460I	M460V	H520Q	C592G	A594V	L595S	C603W	D605E	C607Y
2	hu 3587	-21	PCR neg.								
	hu 3588	9	0%	6,4%	0%	4,9%	3,3%	4,3%	0%	63,3%	0%
	hu 3589	14	0%	7,3%	0%	4,0%	6,1%	4,6%	2,5%	57,2%	0%
	hu 3590	27	3,8%	6,8%	0%	5,8%	3,3%	4,1%	1,4%	64,9%	0%
	hu 3591	31	0%	0%	0%	6,1%	3,4%	5,7%	4,7%	84,1%	0%
	hu 3593	35	3,5%	6,1%	0%	6,4%	5,3%	8,8%	0,2%	67,8%	0%
	hu 3595	38	3,6%	6,3%	0%	4,7%	3,6%	4,1%	2,3%	59,9%	0%

PCR neg. PCR erbrachte im jeweiligen Assay kein Amplifikat

	Mutantenanteil 0-6%, unterhalb der PSQ-Nachweisgrenze
	Mutantenanteil 6-10%
	Mutantenanteil 10-100%

Die wiederholte Abstoßung des Transplantats machte im weiteren Verlauf eine zweimalige Retransplantation erforderlich. Klinisch entwickelte der Patient, unter steigender HCMV-Last sowie positivem Nachweis von Adenoviren vom Typ C, eine interstitielle Pneumonie mit Pleuraerguss, die sich unter der medikamentösen Therapie nicht kontrollieren ließ.

#### 4.3.4.3 Patient 3

Bei Patient 3 wurde nach Organtransplantation (Tag 0) mit der prophylaktischen Gabe von Ganciclovir begonnen. Unter dieser wurde in der Probe hu 3675 von Tag 29 nach TX erstmals HCMV im Blut des Patienten festgestellt. Unter fortlaufender Therapie wurden mittels Sanger-Sequenzierung an Tag 120 nach TX zwei Resistenzmutanten detektiert, welche zu etwa 50% neben dem Wildtyp vorlagen. Es erfolgte eine Therapieumstellung auf Foscavir. Nach längerer Persistenz einer mäßig hohen Viruslast kam es hierunter zum Rückgang der Genomkopienzahl

bis unter die messbare Grenze. In der PSQ zeigten sich in Assay 1 und 2 vereinzelt Mutationen in den Codons 460 und 520. Auffallend waren jedoch die in Assay 3 detektierten Resistenz-assoziierten Mutation L595S und C603W. Diese ließen sich in allen untersuchten Proben zwischen Tag 85 und Tag 133 nach TX (L595S) sowie zwischen Tag 92 und Tag 138 nach TX (C603W) mit signifikanten Mutantenanteilen nachweisen. Klinisch blieben Symptome einer CMV Infektion aus. In den durch die Charité erfolgten Folgeanalysen blieben alle getesteten Proben bis einschließlich Tag 809 nach TX CMV-negativ.

**Tab. 4.5 Mittels Pyrosequenzierung nachgewiesene Mutantenanteile in mischinfiziertem Patientenmaterial geordnet nach dem Entnahmetag nach Transplantation (TX) und im jeweiligen Assay erfasster Punktmutation**

Patient	Probe	Tag nach TX	Assay 1		Assay 2	Assay 3					
			M460I	M460V	H520Q	C592G	A594V	L595S	C603W	D605E	C607Y
3	hu 3673	11	15%	0%	0%	PCR neg.					
	hu 3674	18	PCR neg.								
	hu 3675	29	0,0%	0%	PCR neg.	2,6%	3,2%	26,1%	0%	3,3%	0%
	hu 3676	36	2,5%	17,1%	0%	4,5%	3,4%	3,0%	0%	3,4%	0%
	hu 3677	40	2,8%	0%	0%	3,0%	2,8%	3,2%	0%	0%	0%
	hu 3678	43	0%	0%	0%	3,3%	0%	5,2%	0%	4,1%	0%
	hu 3679	47	13,5%	7,7%	0%	1,8%	2,7%	4,4%	0%	2,1%	0%
	hu 3680	51	0%	0%	0%	1,6%	3,4%	4,7%	0%	3,1%	0%
	hu 3681	54	0%	0%	0%	4,3%	4,3%	4,0%	0%	0,2%	0%
	hu 3682	64	0,5%	0%	7,3%	3,9%	3,9%	3,6%	0%	2,1%	0%
	hu 3683	85	0%	0%	0%	4,0%	0%	26,0%	0%	4,2%	0%
	hu 3684	92	4,1%	0%	0%	0%	2,8%	27,5%	8,8%	2,1%	0%
	hu 3685	99	3,4%	3,4%	0%	2,8%	3,1%	37,4%	26,2%	2,4%	0%
	hu 3686	106	4,0%	0%	0%	0%	4,9%	29,6%	13,6%	0,1%	0%
	hu 3687	111	2,9%	3,1%	0%	0%	5,7%	35,2%	14,2%	2,0%	0%
	hu 3688	114	4,2%	0%	0%	0%	5,3%	36,6%	24,4%	1,6%	0%
	hu 3689	117	3,1%	2,9%	0%	4,4%	7,4%	37,0%	26,5%	1,8%	0%
	hu 3965	120	0%	0%	0%	5,4%	9,5%	36,9%	31,5%	0,1%	0%
	hu 3966	121	2,2%	3,7%	9,2%	6,9%	6,4%	37,0%	32,2%	4,5%	0%
hu 3967	124	0%	0%	10,8%	6,6%	5,6%	37,3%	32,1%	1,2%	0%	
hu 3968	133	0%	0%	failed	4,7%	3,7%	46,1%	32,4%	1,0%	0%	
hu 3969	138	0%	5,0%	failed	6,1%	0%	3,3%	82,4%	2,8%	0%	

PCR neg. PCR erbrachte im jeweiligen Assay kein Amplifikat

failed keine Sequenz erhalten

Mutantenanteil 0-6%, unterhalb der PSQ-Nachweisgrenze  
 Mutantenanteil 6-10%  
 Mutantenanteil 10-100%

#### 4.3.4.4 Patient 4

Patient 4 wurden über einen Zeitraum von neun Wochen nach erfolgter Organtransplantation insgesamt 14 Proben entnommen und auf HCMV-DNA untersucht. Vor der Transplantation wurde der Patient CMV-negativ getestet, während es sich beim Transplantat um ein Organ eines CMV-positiven Donors handelte. Dabei erfolgte an Tag 20 nach TX in Probe hu 3557 erstmals ein positiver Virusnachweis im *LightCycler* des Virologischen Instituts der Charité. Klinisch

bestand der Verdacht auf eine CMV-Pneumonie. Es erfolgte die Einleitung einer Therapie mit Ganciclovir unter der sich laborchemisch im Verlauf ein starker Anstieg der Viruslast zeigte. Bei korrelierend klinisch lebensbedrohlicher Situation fand trotz fehlendem Mutationsnachweis in der Sequenzierung nach Sanger an Tag 35 nach TX die Umstellung der antiviralen Therapie auf Foscavir, ergänzt durch die Gabe von Immunglobulinen (Kiovig), statt. In der Pyrosequenzierung konnte bereits in der Probe hu 3552 von Tag 6 nach TX erstmals HCMV DNA nachgewiesen werden. Zudem zeigte sich im Pyrogramm ein Peak an Position 460, entsprechend einem Mutantenanteil von 9,6 %. In späteren Proben konnte dieser allerdings nicht erneut identifiziert werden. Zudem fand sich in Probe hu 3558 von Tag 22 nach TX eine Mutation im Codon 595, die ebenfalls im weiteren Verlauf nicht wiederholt nachgewiesen werden konnte. In beiden Proben konnte im Gegensatz zum PSQ-Assay in der quantitativen PCR keine Virus-DNA nachgewiesen werden.

**Tab. 4.6 Mittels Pyrosequenzierung nachgewiesene Mutantenanteile in mischinfiziertem Patientenmaterial geordnet nach dem Entnahmetag nach Transplantation (TX) und im jeweiligen Assay erfasster Punktmutation**

Patient	Probe	Tag nach TX	Assay 1		Assay 2	Assay 3						
			M460I	M460V	H520Q	C592G	A594V	L595S	C603W	D605E	C607Y	
4	hu 3551	2	PCR neg.									
	hu 3552	6	9,6%	0,0%	PCR neg.	5,5%	0%	0%	2,0%	1,0%	0%	
	hu 3553	9	PCR neg.									
	hu 3554	13	PCR neg.	PCR neg.	PCR neg.	0%	0%	0%	0%	0%	0%	
	hu 3555	14	PCR neg.	PCR neg.	PCR neg.	2,8%	0%	0%	1,6%	0%	0%	
	hu 3556	15	0%	5,1%	0%	2,4%	0%	7,1%	0%	0%	0%	
	hu 3557	20	0%	0%	0%	3,5%	0%	0%	0,8%	0,8%	0%	
	hu 3558	22	0%	0%	PCR neg.	0%	0%	11,9%	0%	5,1%	0%	
	hu 3559	23	0%	0%	0%	4,2%	0%	0%	0%	5,9%	0%	
	hu 3560	29	3,8%	0%	0%	2,9%	0%	0%	0%	0,2%	0%	
	hu 3561	30	0%	4,2%	0%	5,2%	0%	0%	0%	2,3%	0%	
	hu 3562	33	0,8%	0%	0%	1,1%	0%	0%	2,1%	6,4%	0%	
	hu 3563	38	0%	5,3%	0%	4,5%	0%	0%	0,1%	1,8%	0%	
hu 3564	41	PCR neg.	PCR neg.	0%	7,8%	0%	0%	0,7%	3,5%	0%		

PCR neg PCR erbrachte im jeweiligen Assay kein Amplifikat

Mutantenanteil 0-6%, unterhalb der PSQ-Nachweisgrenze  
 Mutantenanteil 6-10%  
 Mutantenanteil 10-100%

#### 4.3.4.5 Patient 5

Patient 5 erhielt eine T-Zell depletierte, allogene Stammzelltransplantation. Bei CMV DNA-ämie wurde an Tag 28 nach TX eine antivirale Therapie mit Ganciclovir begonnen, welche im Verlauf auf Valganciclovir umgestellt wurde. Im weiteren Verlauf entschied man sich bei steigender Viruslast und ausgeprägter Leukopenie an Tag 98 nach TX für einen Wechsel auf

Foscavir, worunter die Viruslast effektiv gesenkt und die Therapie wieder beendet werden konnte. 17 Wochen später wurde bei CMV-Pneumonie eine erneute antivirale Therapie mit Ganciclovir notwendig, die im weiteren Verlauf durch die Gabe von Immunglobulinen ergänzt werden musste. Analysiert wurden im Rahmen dieser Arbeit im Zeitraum von Tag 14 bis Tag 115 nach Transplantation entnommene Proben. Die Sequenzanalyse mittels Pyrosequenzierung wies dabei vereinzelt die Mutationen A594V und L595S in Probe hu 3568 nach, die jedoch in den Folgeproben nicht erneut in signifikanter Höhe detektiert wurden.

**Tab. 4.7 Mittels Pyrosequenzierung nachgewiesene Mutantenanteile in mischinfiziertem Patientenmaterial geordnet nach dem Entnahmetag nach Transplantation (TX) und im jeweiligen Assay erfasster Punktmutation**

Patient	Probe	Tag nach TX	Assay 1		Assay 2	Assay 3					
			M460I	M460V	H520Q	C592G	A594V	L595S	C603W	D605E	C607Y
5	hu 3565	14	1,2%	0%	0%	1,8%	7,4%	7,1%	0%	3,8%	0%
	hu 3566	21	0,7%	0%	0%	4,9%	0%	4,3%	0%	1,7%	0%
	hu 3567	28	0%	0%	0%	5,4%	0%	0%	2,0%	0,6%	0%
	hu 3568	30	0%	0%	0%	0%	16,6%	10,5%	0%	3,0%	0%
	hu 3569	32	0%	0%	0%	4,2%	0%	0%	0%	0,9%	0%
	hu 3570	32	0%	0%	0%	0,7%	0%	3,5%	0%	0%	0%
	hu 3571	37	0%	0%	0%	4,8%	0%	0%	0%	0,7%	0%
	hu 3572	39	0%	0%	0%	3,6%	0%	7,1%	0%	0,3%	0%
	hu 3573	42	3%	0%	0%	2,1%	4,9%	8,6%	0%	1,0%	0%
	hu 3574	46	0%	0%	0%	1,6%	0%	0%	0%	0%	0%
	hu 3575	51	1,5%	0%	0%	5,7%	0%	7,7%	1,8%	0,3%	0%
	hu 3576	63	0%	0%	0%	6,9%	0%	0%	4,3%	0,8%	0%
	hu 3577	74	1,3%	0%	0%	7,2%	0%	5,4%	0%	1,0%	0%
	hu 3578	77	0,7%	0%	0%	1,8%	0%	4,8%	0%	2,8%	0%
	hu 3579	99	0%	0%	0%	6,8%	3,7%	3,4%	0%	2,3%	0%
	hu 3580	101	0%	0%	0%	3,2%	0%	0%	0%	0,7%	0%
	hu 3581	102	0%	0%	0%	8,2%	0%	4,9%	2,9%	1,7%	0%
	hu 3582	105	3,0%	3,6%	0%	4,9%	0%	5,7%	1,3%	4,6%	0%
	hu 3583	107	4,2%	4,3%	0%	9,1%	0%	0%	2,4%	3,4%	0%
	hu 3584	108	0%	5,2%	0%	5,7%	0%	8,9%	3,4%	0,9%	0%
hu 3585	112	5,3%	5,0%	0%	9,1%	0%	0%	2,6%	0%	0%	
hu 3586	115	0%	0%	0%	4,9%	0%	0%	0%	0,3%	0%	

	Mutantenanteil 0-6%, unterhalb der PSQ-Nachweisgrenze
	Mutantenanteil 6-10%
	Mutantenanteil 10-100%

#### 4.3.4.6 Patient 6

Patient 6 erhielt eine allogene Stammzelltransplantation. Bei steigender Viruslast wurde an Tag 37 nach Transplantation die medikamentöse Therapie mit GCV begonnen, worunter die Viruslast kontinuierlich gesenkt werden konnte. Korrelierend zu einem guten Therapieansprechen konnten in der Pyrosequenzierung keine Resistenz-assoziierten Mutationen nachgewiesen werden.

**Tab. 4.8 Mittels Pyrosequenzierung nachgewiesene Mutantenanteile in mischinfiziertem Patientenmaterial geordnet nach dem Entnahmetag nach Transplantation (TX) und im jeweiligen Assay erfasster Punktmutation**

Patient	Probe	Tag vor/nach TX	Assay 1		Assay 2	Assay 3					
			M460I	M460V	H520Q	C592G	A594V	L595S	C603W	D605E	C607Y
6	hu 3596	-10	0%	0%	0%	PCR neg.					
	hu 3597	-6	PCR neg.								
	hu 3598	-3	PCR neg.								
	hu 3599	1	PCR neg.								
	hu 3601	4	PCR neg.	PCR neg.	0%	PCR neg.					
	hu 3602	11	PCR neg.								
	hu 3603	15	PCR neg.								
	hu 3604	18	PCR neg.								
	hu 3605	22	PCR neg.								
	hu 3606	25	0%	0%	0%	PCR neg.					
	hu 3607	29	0%	0%	0%	PCR neg.					
	hu 3608	32	0%	0%	3,4%	0%	0%	0%	8,5%	2,4%	0%
	hu 3609	36	2,7%	2,8%	0%	1,9%	0%	0%	0%	5,4%	0%
	hu 3610	37	0%	0%	2,4%	5,4%	0%	0%	2,9%	3,1%	0%
	hu 3611	39	0%	0%	0%	4,4%	0%	0%	0,5%	0,8%	0%
	hu 3612	43	0%	0%	0%	3,2%	0%	0%	3,4%	5,9%	0%
	hu 3613	46	0%	0%	0%	4,7%	0%	5,3%	2,5%	3,6%	0%
	hu 3614	50	4,8%	0%	0%	0%	0%	2,0%	1,5%	2,0%	0%
	hu 3615	53	0%	0%	0%	failed	failed	failed	failed	failed	failed
	hu 3616	57	4,6%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
hu 3618	60	4,6%	0%	0%	PCR neg.						
hu 3619	64	PCR neg.	PCR neg.	0%	PCR neg.						
hu 3620	67	PCR neg.	PCR neg.	0%	PCR neg.						

PCR neg. PCR erbrachte im jeweiligen Assay kein Amplifikat

Mutantenanteil 0-6%, unterhalb der PSQ-Nachweisgrenze  
 Mutantenanteil 6-10%

failed keine Sequenz erhalten

#### 4.3.4.7 Patient 7

Bei Patient 7 wurden bereits vor Organtransplantation hohe CMV-Titer detektiert und bei ansteigender Viruslast mit GCV behandelt. Hierunter konnte diese effektiv gesenkt werden. Es erfolgte stets der Nachweis reiner Wildtyp-Stämme. Nach erfolgter Transplantation, drei Monate später sowie 15 Monate nach der Transplantation kam es jeweils zu einem erneuten Anstieg, woraufhin die antivirale Therapie mit GCV erneut begonnen wurde. Hierunter wurden neben erheblichen Schwankungen der Viruslast auch starke Schwankungen des Ganciclovir-Spiegels im Patientenblut festgestellt. 22 Monate nach der Transplantation kam es klinisch zu anhaltenden Diarrhoen. Im Anschluss erfolgte an Tag 692 nach TX in den Untersuchungen der Charité erstmals der Nachweis GCV-resistenten HCMV-Stämme im Patientenblut. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Proben von einem Zeitraum 5 Monate vor (-133 Tage) bis 21 Monate nach (671 Tage) erfolgter Transplantation analysiert. Mit Hilfe der Pyrosequenzierung erfolgte weit vor

Tag 692 wiederholt der Nachweis Resistenz-assoziiierter Mutationen in den Codons 460, 592 und 594.

**Tab. 4.9 Mittels Pyrosequenzierung nachgewiesene Mutantenanteile in mischinfiziertem Patientenmaterial geordnet nach dem Entnahmetag nach Transplantation (TX) und im jeweiligen Assay erfasster Punktmutation**

Patient	Probe	Tag vor/nach TX	Assay 1		Assay 2	Assay 3						
			M460I	M460V	H520Q	C592G	A594V	L595S	C603W	D605E	C607Y	
7	hu 3521	-133	PCR neg.									
	hu 3522	-133	PCR neg.									
	hu 3523	-133	PCR neg.									
	hu 3524	-127	PCR neg.									
	hu 3525	-127	PCR neg.									
	hu 3526	-120	0%	0%	0%	2,0%	0%	0%	0%	0%	4,5%	0%
	hu 3527	-120	0%	0%	0%	4,6%	4,6%	9,6%	0%	1,8%	0%	0%
	hu 3528	-113	0,7%	0%	0%	0%	5,8%	3,3%	0%	1,0%	0%	0%
	hu 3529	-113	0,2%	0%	0%	1,5%	4,5%	3,3%	0%	4,5%	0%	0%
	hu 3530	-99	0%	0%	0%	2,9%	0%	0%	1,6%	0%	0%	0%
	hu 3531	-92	0%	3,8%	0%	5,1%	3,1%	3,3%	0%	5,8%	0%	0%
	hu 3532	-74	2,7%	3,4%	0%	3,4%	3,1%	2,5%	0%	3,0%	0%	0%
	hu 3533	-69	2,9%	3,7%	2,1%	3,9%	2,9%	3,0%	0%	4,7%	0%	0%
	hu 3534	-57	3,0%	4,0%	0%	5,0%	3,3%	3,6%	0%	1,0%	0%	0%
	hu 3535	0	0%	3,6%	0%	4,8%	2,8%	4,3%	0%	1,2%	0%	0%
	hu 3536	7	0%	4,2%	0%	6,1%	0%	9,6%	1,8%	7,7%	0%	0%
	hu 3537	43	1,2%	0%	0%	23,1%	8,5%	4,6%	0,3%	1,6%	0%	0%
	hu 3538	43	0,4%	3,6%	0%	21,2%	13,3%	0%	0%	3,4%	0%	0%
	hu 3540	55	0%	4,2%	0%	11,0%	8,9%	0%	1,6%	0,4%	0%	0%
	hu 3541	55	0%	0%	0%	13,0%	8,3%	0%	0%	5,2%	0%	0%
	hu 3542	56	3,0%	2,5%	0%	52,5%	20,0%	3,4%	0%	2,4%	0%	0%
	hu 3543	91	2,5%	3,0%	0%	58,1%	17,1%	4,4%	0%	3,6%	0%	0%
	hu 3544	104	3,0%	2,8%	0%	62,0%	16,3%	3,4%	0%	4,0%	0%	0%
	hu 3546	111	4,2%	0%	0%	53,5%	20,2%	3,3%	0%	3,0%	0%	0%
	hu 3547	233	4,1%	3,3%	0%	17,1%	31,3%	3,6%	0%	4,6%	0%	0%
	hu 3549	293	6,0%	10,5%	0%	7,4%	19,9%	3,2%	0%	2,2%	0%	0%
	hu 3550	293	0%	0%	5,2%	19,6%	9,8%	4,0%	0%	4,5%	0%	0%
	hu 3948	451	0%	12,2%	0%	0%	18,9%	7,7%	7,7%	0%	9,4%	0%
hu 3949	482	0%	26,4%	0%	8,9%	24,9%	6,6%	3,1%	1,7%	0%	0%	
hu 4160	649	4,8%	16,3%	6,7%	6,9%	45,3%	4,2%	0%	11,9%	2,4%	0%	
hu 4161	671	2,9%	9,9%	3,1%	9,9%	39,0%	2,9%	0%	0,3%	0,0%	0%	

PCR neg. PCR erbrachte im jeweiligen Assay kein Amplifikat

Mutantenanteil 0-6%, unterhalb der PSQ-Nachweisgrenze  
 Mutantenanteil 6-10%  
 Mutantenanteil 10-100%

#### 4.3.4.8 Patient 8

Patient 8 erhielt eine allogene Stammzelltransplantation. Bei CMV-Reaktivierung wurde die anti-HCMV-Therapie mit Val-GCV an Tag 51 nach Transplantation begonnen. Hierauf zeigte sich in den *LightCycler* Messungen ein gutes Ansprechen mit einem entsprechenden Rückgang der Viruslast. In der Pyrosequenzierung zeigte sich um den Zeitraum des Therapiebeginns herum vereinzelt die Mutation L595S, für die jedoch im weiteren Verlauf kein signifikanter Nachweis

mehr erfolgen konnte. Klinisch kam es neben der Reaktivierung von CMV auch zu einer Reaktivierung von EBV mit Verdacht auf ZNS-Beteiligung.

**Tab. 4.10 Mittels Pyrosequenzierung nachgewiesene Mutantenanteile in mischinfiziertem Patientenmaterial geordnet nach dem Entnahmetag nach Transplantation (TX) und im jeweiligen Assay erfasster Punktmutation**

Patient	Probe	Tag nach TX	Assay 1		Assay 2	Assay 3					
			M460I	M460V	H520Q	C592G	A594V	L595S	C603W	D605E	C607Y
8	hu 3712	25	PCR neg.	PCR neg.	PCR neg.	4,9%	4,8%	7,5%	0%	3,8%	0%
	hu 3713	32	0,2%	0%	PCR neg.	6,7%	0%	7,9%	0%	2,7%	0%
	hu 3714	47	0%	6,1%	0%	5,3%	0%	19,5%	0%	5,6%	0%
	hu 3715	54	1,0%	0%	0%	3,7%	0%	14,9%	1,1%	4,5%	0%
	hu 3716	56	0%	6,7%	0%	6,1%	3,8%	6,0%	0%	1,8%	0%
	hu 3717	60	0%	0%	0%	5,3%	4,8%	9,4%	0%	4,3%	0%
	hu 3718	63	1,4%	6,4%	0%	6,7%	0%	11,2%	0%	5,2%	0%
	hu 3719	68	0%	5,8%	0%	8,8%	4,6%	5,6%	0%	3,6%	0%
	hu 3727	71	0%	3,9%	0%	4,4%	0%	3,5%	0%	1,3%	0%
	hu 3728	78	7,1%	0%	2,8%	4,5%	0%	0%	0%	1,0%	0%
	hu 3729	83	PCR neg.	PCR neg.	0%	PCR neg.					
	hu 3730	88	5,3%	0%	0%	6,5%	0%	3,2%	0%	2,5%	0%
hu 3731	90	4,2%	0%	0%	3,3%	0%	3,4%	0%	3,9%	0%	
hu 3732	95	PCR neg.	PCR neg.	0%	5,5%	0%	4,2%	0,2%	3,9%	0%	

PCR neg. PCR erbrachte im jeweiligen Assay kein Amplifikat

	Mutantenanteil 0-6%, unterhalb der PSQ-Nachweisgrenze
	Mutantenanteil 6-10%
	Mutantenanteil 10-100%

#### 4.3.4.9 Patient 9

In den entnommenen Proben von Patient 9 zeigte sich im Zeitraum zwischen Tag 35 und Tag 52 nach Organtransplantation ein rapider Anstieg der Viruslast. Klinisch kam es nach CMV Reaktivierung zur drohenden Transplantatabstoßung. Ab Tag 17 nach TX erfolgte eine antivirale Therapie mit Aciclovir, welches an Tag 43 nach TX auf GCV umgestellt wurde. Eine Mutation konnte zu keinem Zeitpunkt detektiert werden.

**Tab. 4.11 Mittels Pyrosequenzierung nachgewiesene Mutantenanteile in mischinfiziertem Patientenmaterial geordnet nach Entnahmedatum und im jeweiligen Assay erfasster Punktmutation.**

Patient	Probe	Tag nach TX	Assay 1		Assay 2	Assay 3					
			M460I	M460V	H520Q	C592G	A594V	L595S	C603W	D605E	C607Y
9	hu 3962	35	0,4%	0%	0%	5,0%	3,2%	0,0%	0%	2,5%	0%
	hu 3963	44	0%	3,9%	0%	4,1%	2,8%	2,7%	0%	4,1%	0%
	hu 3964	52	2,8%	3,1%	0%	8,2%	0%	0%	3,5%	3,7%	0%
	hu 4159	59	PCR neg.								

PCR neg. PCR erbrachte im jeweiligen Assay kein Amplifikat

	Mutantenanteil 0-6%, unterhalb der PSQ-Nachweisgrenze
	Mutantenanteil 6-10%

#### 4.3.4.10 Patient 10

Nach einer unter der Risikokonstellation eines CMV-positiven Donors bei CMV-negativem Empfänger durchgeführten Organtransplantation erfolgte zunächst eine 90-tägige prophylaktische Ganciclovir Gabe. Die mittels Pyrosequenzierung analysierten fünf Proben des Patienten wurden nach Beendigung der GCV-Prophylaxe entnommen. Um Tag 195 nach TX herum wurde erstmals CMV-DNA im Blut des Patienten nachgewiesen, woraufhin mit der präemptiven Gabe von Valganciclovir begonnen wurde. Unter der genannten Therapie konnte zwar ein Abfall der Viruslast erzielt werden, diese sank jedoch nicht unter die Nachweisgrenze. Bereits in der Probe hu 3971 von Tag 195 nach TX erfolgte der Nachweis der Mutation C603W mit signifikanten Anteilen in der Mischpopulation. Im weiteren Therapieverlauf traten zudem Mutationen im Codon 594, 595 und 607 hinzu. Es wurde eine Therapieumstellung auf Foscarnet erwogen, die jedoch aufgrund der anhaltend niedrigen Viruslast und fehlender klinischer Symptomatik nicht umgesetzt wurde.

**Tab. 4.12 Mittels Pyrosequenzierung nachgewiesene Mutantenanteile in mischinfiziertem Patientenmaterial geordnet nach Entnahmetag und im jeweiligen Assay erfasster Punktmutation**

Patient	Probe	Tag nach TX	Assay 1		Assay 2	Assay 3					
			M460I	M460V	H520Q	C592G	A594V	L595S	C603W	D605E	C607Y
10	hu 3970	155	PCR neg.	PCR neg.	0%	2,3%	0%	0%	0%	0%	0%
	hu 3971	195	6,7%	0%	0%	7,6%	0%	0%	79,8%	0%	0%
	hu 3972	225	0,6%	5,0%	0%	4,8%	0%	0%	68,4%	1,2%	0%
	hu 3973	238	3,3%	4,2%	0%	6,4%	0%	0%	87,8%	0%	0%
	hu 3974	245	3,0%	0%	0%	0%	11,1%	18,1%	78,1%	6,7%	10,4%

**PCR neg.** PCR erbrachte im jeweiligen Assay kein Amplifikat

	Mutantenanteil 0-6%, unterhalb der PSQ-Nachweisgrenze
	Mutantenanteil 6-10%
	Mutantenanteil 10-100%

#### 4.3.4.11 Patient 11

Patient 11 erhielt eine allogene Stammzelltransplantation. Im Verlauf entwickelte der Patient eine Pneumonie. Es bestand der Verdacht auf eine CMV-Reaktivierung mit zerebraler Beteiligung. Ob eine anzunehmende virostatische Therapie erfolgte, ist nicht bekannt. Mittels Pyrosequenzierung wurden Proben aus dem Zeitraum von Tag 20 bis Tag 174 nach Transplantation analysiert. Eine Resistenz-assoziierte Mutation konnte mittels PSQ zu keinem Zeitpunkt detektiert werden.

**Tab. 4.13 Mittels Pyrosequenzierung nachgewiesene Mutantenanteile in mischinfiziertem Patientenmaterial geordnet nach dem Entnahmetag nach Transplantation (TX) und im jeweiligen Assay erfasster Punktmutation**

Patient	Probe	Tag nach TX	Assay 1		Assay 2	Assay 3						
			M460I	M460V	H520Q	C592G	A594V	L595S	C603W	D605E	C607Y	
11	hu 3975	20	PCR neg.									
	hu 3976	27	PCR neg.	PCR neg.	0%	4,5%	0%	0%	0%	4,0%	0%	
	hu 3977	63	PCR neg.	PCR neg.	PCR neg.	2,7%	4,0%	4,6%	0%	1,6%	0%	
	hu 3978	77	6,7%	0%	0%	3,2%	0%	4,2%	0%	3,2%	0%	
	hu 3979	94	0%	0%	0%	2,7%	3,7%	4,1%	0%	1,5%	0%	
	hu 3980	98	0%	0%	0%	3,0%	3,9%	4,0%	0%	1,5%	0%	
	hu 3981	101	0%	0%	0%	2,9%	4,2%	4,2%	0%	3,3%	0%	
	hu 3982	105	3,0%	2,8%	0%	4,0%	4,2%	4,3%	0%	3,8%	0%	
	hu 3983	113	0%	0%	0%	2,6%	0%	5,2%	0%	2,6%	0%	
	hu 3984	119	0%	0%	0%	2,0%	5,1%	4,8%	0%	3,3%	0%	
	hu 3985	142	PCR neg.	PCR neg.	0%	1,1%	4,2%	0%	0%	0,6%	0%	
	hu 3986	154	0%	0%	0%	3,1%	0%	4%	0%	3,2%	0%	
	hu 3987	163	PCR neg.	PCR neg.	0%	2,3%	0%	0%	0%	3,3%	0%	
	hu 3988	167	0%	0%	0%	4,0%	0%	3,4%	0%	2,1%	0%	
	hu 3989	172	3,0%	4,2%	0%	1,3%	0%	0%	0%	6,0%	0%	
hu 3990	174	0%	0%	0%	4,0%	4,4%	4,5%	0%	3,8%	0%		

PCR neg. PCR erbrachte im jeweiligen Assay kein Amplifikat

Mutantenanteil 0-6%, unterhalb der PSQ-Nachweisgrenze  
 Mutantenanteil 6-10%

#### 4.3.4.12 Patient 12

Auch Patient 12 erhielt eine Stammzelltransplantation. Drei Monate später kam es zu einer CMV-Reaktivierung. Es wurde eine antivirale Therapie mit Ganciclovir eingeleitet. In den mittels PSQ untersuchten Proben von Tag 13 bis Tag 121 nach Transplantation wurden vereinzelt in Probe hu 3995 die Mutationen A594V, L595S und C607Y nachgewiesen, die in den Folgeproben nicht nochmals detektiert wurden. Ähnlich verhält es sich mit der Mutation M460I in Probe hu 3998, die ebenfalls nur einmalig nachgewiesen wurde.

**Tab. 4.14 Mittels Pyrosequenzierung nachgewiesene Mutantenanteile in mischinfiziertem Patientenmaterial geordnet nach dem Entnahmetag nach Transplantation (TX) und im jeweiligen Assay erfasster Punktmutation**

Patient	Probe	Tag nach TX	Assay 1		Assay 2	Assay 3					
			M460I	M460V	H520Q	C592G	A594V	L595S	C603W	D605E	C607Y
12	hu 3991	13	0%	0%	0%	PCR neg.					
	hu 3992	21	0%	0%	0%	PCR neg.					
	hu 3993	41	3,0%	0%	PCR neg.	3,9%	7,0%	4,0%	0%	1,2%	4,5%
	hu 3994	76	PCR neg.	PCR neg.	5,1%	PCR neg.					
	hu 3995	86	0%	0%	4,5%	0,0%	10,3%	11,6%	3,6%	3,9%	28%
	hu 3996	97	3,1%	3,1%	4,8%	6,4%	3,4%	2,1%	0%	0,1%	0%
	hu 3997	104	4,0%	3,6%	2,8%	5,5%	3,7%	0%	0%	5,0%	0%
	hu 3998	111	11,4%	0%	0%	5,1%	4,4%	3,8%	0%	2,3%	4,7%
	hu 3999	115	PCR neg.								
	hu 4000	121	PCR neg.								

PCR neg. PCR erbrachte im jeweiligen Assay kein Amplifikat

	Mutantenanteil 0-6%, unterhalb der PSQ-Nachweisgrenze
	Mutantenanteil 6-10%
	Mutantenanteil 10-100%

#### 4.3.4.13 Patient 13

Patient 13 wurde im Rahmen einer stationären Behandlung die Diagnose einer HIV-Infektion gestellt. In Probe hu 4002 erfolgte in den *LightCycler*-Analysen der Charité zudem der Nachweis von CMV-DNA im Patientenblut, wobei es sich um Wildtyp-DNA handelte. Während der Behandlung verzeichnete man einen Rückgang der Viruslast. Über den klinischen Verlauf, sowie die antivirale Therapie liegen keine Daten vor. Eine Resistenz-assoziierte Mutation im HCMV-Genom konnte mittels PSQ zu keinem Zeitpunkt signifikant detektiert werden.

**Tab. 4.15 Mittels Pyrosequenzierung nachgewiesene Mutantenanteile in mischinfiziertem Patientenmaterial geordnet nach Entnahmetag und im jeweiligen Assay erfasster Punktmutation. Dabei wurde die erste analysierte Probe mit Tag 1 gleichgesetzt**

Patient	Probe	Entnahmetag	Assay 1		Assay 2	Assay 3					
			M460I	M460V	H520Q	C592G	A594V	L595S	C603W	D605E	C607Y
13	hu 4001	1	0%	0%	3,0%	0,1%	0%	0%	0%	0,3%	0%
	hu 4002	21	5,3%	4,5%	0%	3,3%	4,4%	2,2%	0%	2,2%	0%
	hu 4003	26	5,2%	3,9%	2,4%	5,0%	3,3%	2,0%	0%	0,8%	0%
	hu 4004	36	5,5%	4,1%	0%	4,7%	6,5%	3,0%	0%	3,7%	4,6%
	hu 3960	41	7,1%	4,2%	3,8%	1,6%	3,6%	4,4%	0%	2,2%	0%
	hu 3961	51	PCR neg.								

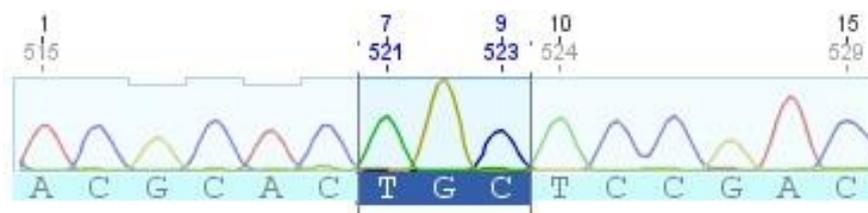
PCR neg. PCR erbrachte im jeweiligen Assay kein Amplifikat

	Mutantenanteil 0-6%, unterhalb der PSQ-Nachweisgrenze
	Mutantenanteil 6-10%

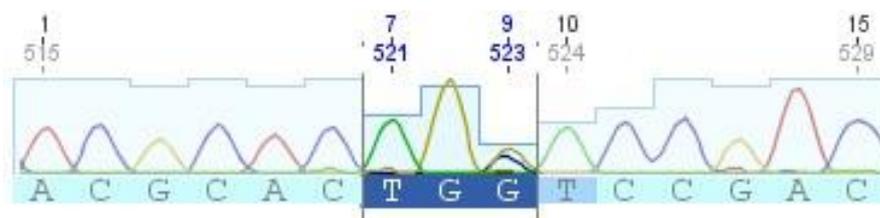
#### 4.4 Vergleich der Pyrosequenzen mit den Ergebnissen der Sanger-Sequenzierung

Grundlage des Vergleichs bildeten die Ergebnisse der UL97 Sequenzierung aller Patientenproben mit dem derzeit als klinischen Goldstandard angewandtem Verfahren nach Sanger. Die hierbei ermittelten Sequenzen sollten zum einen mit Hilfe der Pyrosequenzierung validiert werden, zum anderen galt es insbesondere die Proben zu analysieren, die im zeitlichen Verlauf vor dem ersten Nachweis von Mutationen in der Sanger-Sequenzierung entnommen wurden und diese auf das Vorhandensein geringer HCMV-Mutantenanteile im Wildtypüberschuss zu untersuchen.

a)



b)



**Abb. 4.5 Ergebnisse (exemplarisch) der Sequenzanalysen der Patientenproben hu 3683 (a) & hu 3965 (b) für die Positionen 603**

a) Probe hu 3683 besitzt in Codon 603 (Markierung) zu 100% die Wildtyp-Sequenz TGC.

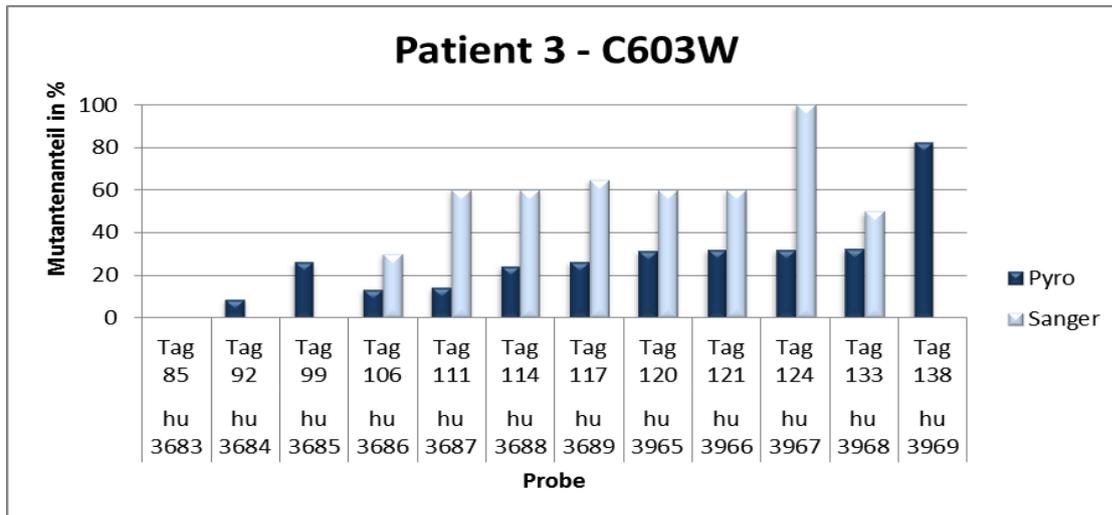
b) In Probe hu 3965 fand sich in Codon 603 (Markierung) ein signifikanter Anteil der Mutationssequenz TGG. Das Verhältnis von Mutante zum Wildtyp liegt hier etwa bei 60% zu 40%.

##### 4.4.1 Ergebnisvergleich mit Sanger bei mittels PSQ nachgewiesener UL97-Mutation

###### 4.4.1.1 Patient 3

In den Proben von Patient 3 ließ sich mittels Sanger-Sequenzierung die Mutation C603W nachweisen. Diese konnte erstmals an Tag 106 nach Transplantation in Probe hu 3686 detektiert werden und machte hier einen Anteil von etwa 25% der Viruspopulation in der untersuchten Probe aus. In den Proben, die im zeitlichen Verlauf vor hu 3686 entnommen wurden, wurde mit dem Verfahren nach Sanger ausschließlich Wildtyp-DNA sequenziert. Auch in der PSQ konnte die genannte Mutation in Probe hu 3686 nachgewiesen werden. Hier lag der Mutantenanteil bei 14%. Jedoch erfolgte mit Hilfe der Pyrosequenzierung der Nachweis der o.g. Mutation bereits in den Proben hu 3684 und hu 3685, welche jeweils 2 und 1 Woche vor Probe hu 3686 entnommen

worden waren. Der Anteil der Resistenz-assoziierten Mutation in der Mischpopulation lag an Tag 99 nach TX bereits bei über 25%.



**Abb. 4.6 Grafische Darstellung der in PSQ und Sanger-Sequenzierung ermittelten Mutantenanteile für Codon 603**

Noch vor dem Nachweis der C603W Mutation zeigte sich in der Sanger-Sequenzierung die Resistenz-assoziierte Mutation L595F in Probe hu 3685 von Tag 99 nach Transplantation. Diese schien den Wildtyp komplett verdrängt zu haben. Auch mittels PSQ wurde in Probe hu 3685 ein in Codon 595 mutierter Virusstamm detektiert. Jedoch wies die Pyrosequenzierung verfahrensbedingt die Mutante L595S nach. Der Mutantenanteil lag in Mischpopulation bei knapp 40%. Ferner gelang der Nachweis der Punktmutation bereits an Tag 85 und 92 nach TX in den Proben hu 3683 und hu 3684. Vereinzelt fiel sie zudem an Tag 29 nach TX auf, wurde jedoch in den folgenden Proben zunächst nicht erneut detektiert.

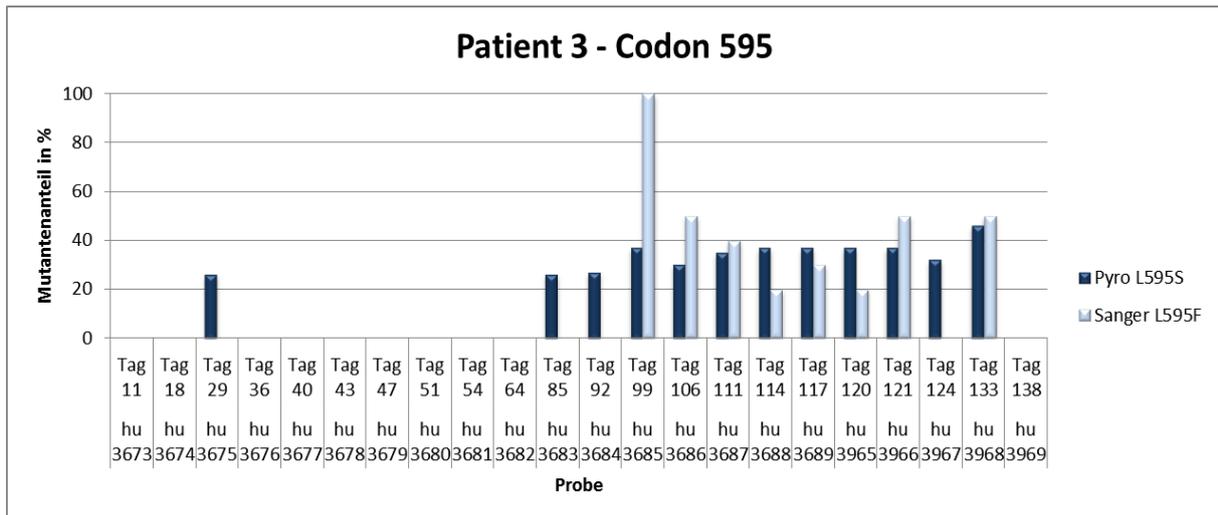


Abb. 4.7 Grafische Darstellung der in PSQ und Sanger-Sequenzierung ermittelten Mutantenanteile für Codon 595

#### 4.4.1.2 Patient 7

Im Probenmaterial von Patient 7 erfolgte der Nachweis der Resistenz-assoziierten Mutation C592G mittels PSQ erstmals an Tag 7 nach Transplantation in Probe hu 3536. In der Sequenzierung nach Sanger konnte ausschließlich der Wildtyp detektiert werden. Ein Nachweis der HCMV-Mutante ließ sich im Sanger-Verfahren erst in der Probe hu 3538 von Tag 43 nach TX erzielen. Hier mit einem Mutantenanteil von etwa 30% in Mischpopulation. Die Probe hu 3537 vom gleichen Tag erbrachte mittels Sanger-Sequenzierung ausschließlich den Nachweis des Wildtyps, während in der PSQ ein Mutantenanteil von 23% detektiert wurde.

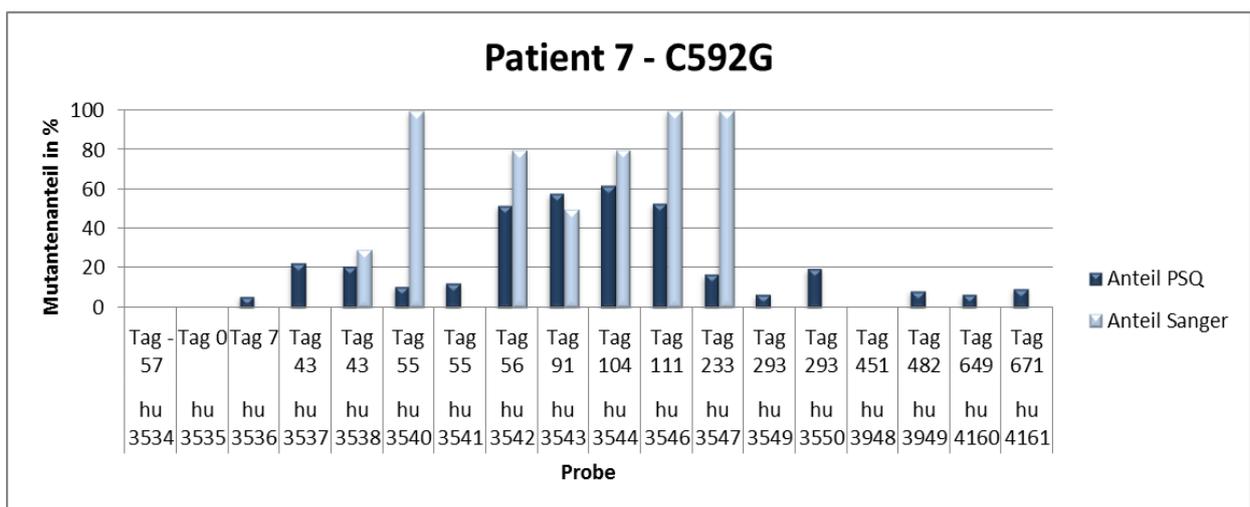


Abb. 4.8 Grafische Darstellung der in PSQ und Sanger-Sequenzierung ermittelten Mutantenanteile für Codon 592

In der Probe hu 3538 von Tag 43 nach erfolgter Transplantation fand sich zudem in der Sequenzierung nach Sanger zu über 60% ein in Codon 594 mutierter Virusstamm. Dieser ließ sich mittels PSQ nur mit einem Anteil von 13% nachweisen, war mit diesem Verfahren jedoch bereits in Probe hu 3537 vom selben Entnahmetag, in der nach Sanger ausschließlich Wildtyp nachzuweisen war, detektiert worden. Mittels PSQ fand sich die Mutante in allen weiteren getesteten Proben, während sie im Verfahren nach Sanger erst an Tag 649 nach TX in Probe hu 4160 erneut detektiert werden konnte.

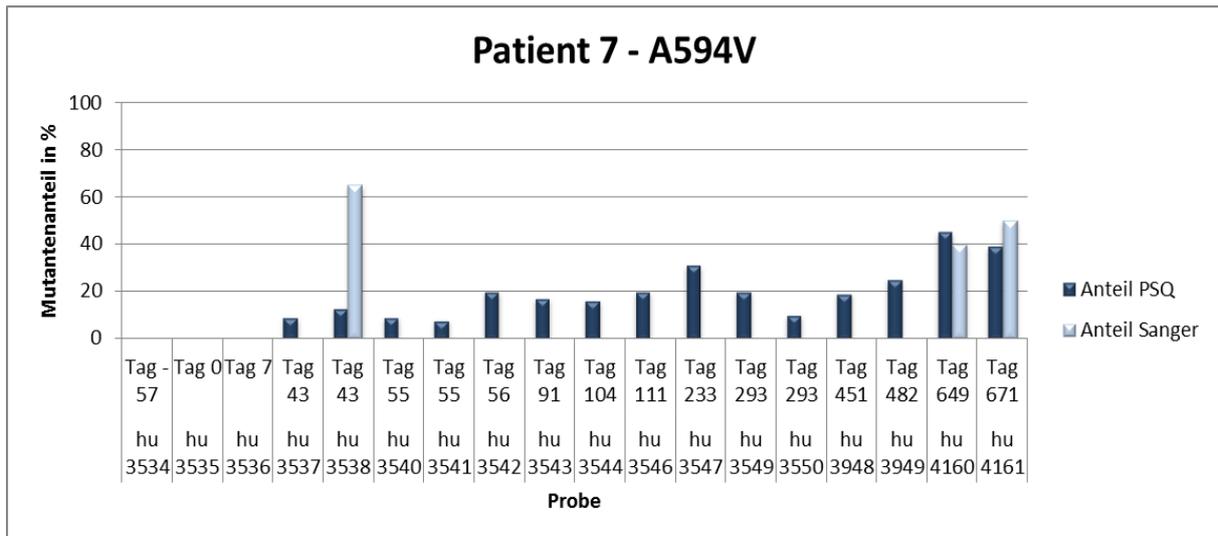
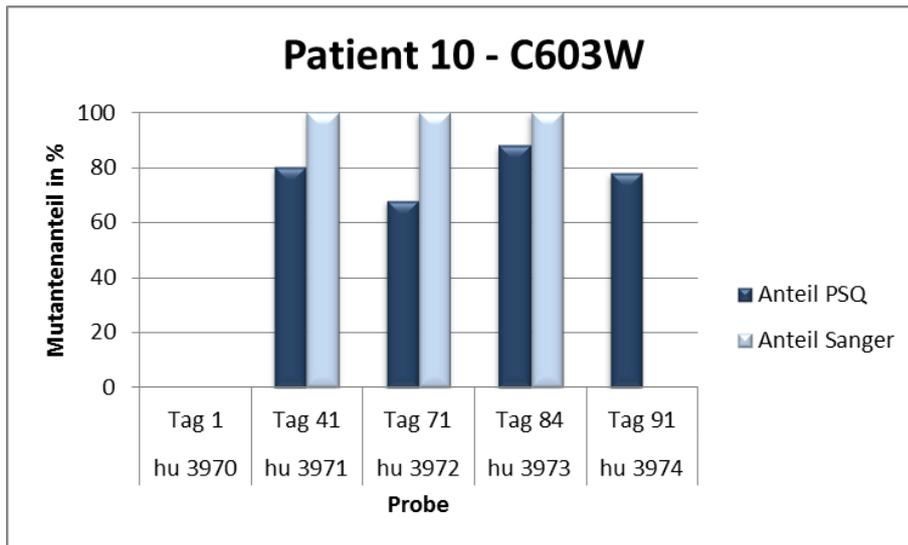


Abb. 4.9 Grafische Darstellung der in PSQ und Sanger-Sequenzierung ermittelten Mutantenanteile für Codon 594

#### 4.4.1.3 Patient 10

Im Probenmaterial von Patient 10 fand sich die Resistenz-assoziierte Mutation C603W in allen untersuchten Proben ab Tag 41 nach TX. Diese ließ sich mit beiden Sequenziermethoden nachweisen. Dabei zeigte sich im Verfahren nach Sanger ausschließlich im Codon 603 mutierte Virus-DNA, während in der PSQ eine Mischpopulation mit Mutantenüberschuss detektiert werden konnte. Die Mutantenanteile lagen dabei stets über 60%. In der untersuchten Probe von Tag 1 wurde in beiden Methoden ausschließlich Wildtyp-DNA gefunden. Für den Zeitraum zwischen Probe hu 3970 und hu 3971 lag kein Probenmaterial zur Amplifikation vor.



**Abb. 4.10 Grafische Darstellung der in PSQ und Sanger-Sequenzierung ermittelten Mutantenanteile für Codon 603**

Im Fall der untersuchten Proben von Patient 10 liegt zwischen der Entnahme von Probe hu 3970, in der keine Mutante detektiert werden konnte, und hu 3971 mit Nachweis eines hohen Anteils der Mutante C603W, ein relativ großer zeitlicher Abstand. Vermutlich kam es in diesem zur Entstehung und Vermehrung des mutierten Virusstammes. Eine Analyse von Patientenmaterial im Intervall hätte gegebenenfalls eine frühere Detektion der Mutante ermöglicht.

#### **4.5 Vergleich der Pyrosequenzierung mit den Ergebnissen der Klonierung**

Mehrere Proben der Patienten 3 und 7 wiesen in der PSQ jeweils zwei oder sogar drei mutierte Positionen im ORF UL97 auf. Um eine Aussage treffen zu können, ob es sich bei diesen Basenveränderungen um einen doppelt mutierten Virusstamm oder aber um das Vorhandensein mehrerer einfach mutierter Virusstämme handelt, wurden die Proben hu 3685 und hu 3689 des Patienten 3, sowie die Proben hu 3542 und hu 3546 des Patienten 7 ausgewählt, um das PSQ-Ergebnis mittels bakterieller Klonierung zu validieren. Hierzu erfolgte zunächst die Amplifikation der Proben in einer nested PCR mit den Primerpaaren 4134 s/as und 4135 s/as. Nach Ligation und Transformation in E-coli Bakterien lag das 690 bp umfassende PCR-Produkt klonal vor. Von jedem Ansatz wurden anschließend bis zu 10 Klone gepickt und mittels Restriktionsverdau und Sanger-Sequenzierung analysiert. Die Tabellen 4.15 und 4.16 zeigen das Ergebnis der Sequenzierung an den Positionen, der in der PSQ ermittelten Mutanten.

**Tabelle 4.16 UL97 Mutantenanteile Patient 3**

		L595F/S	C603W	L595F/S + C603W
hu 3685	PSQ	37%	26%	-
	Klonierung	0% (0/4)	100% (4/4)	0% (0/4)
hu 3689	PSQ	37%	26%	-
	Klonierung	57% (4/7)	43% (2/7)	0% (0/7)

Von der Probe hu 3685 konnten nur vier Klone erfolgreich sequenziert werden. Alle vier Klone weisen jedoch ausschließlich die Mutation C603W auf. Die Mutation L595F (Klonierung/Sanger) bzw. L595S (PSQ) konnte in keinem der Klone nachgewiesen werden. Die zweite der Klonierung zugeführte Probe des Patienten 3 hu 3689 konnte sieben Mal erfolgreich kloniert und sequenziert werden. Hierbei zeigten zwei der sieben Klone die Mutation C603W, vier Klone waren ausschließlich im Codon 595 mutiert und ein Klon zeigte an beiden Positionen den Wildtyp.

**Tabelle 4.17 UL97- Mutantenanteile Patient 7**

		C592G	A594V	C592G + A594V	WT
hu 3542	PSQ	52%	20%	-	28%
	Klonierung	100% (10/10)	0% (0/10)	0% (0/10)	0%
hu 3546	PSQ	53%	20%	-	27%
	Klonierung	33% (3/9)	67% (6/9)	0% (0/9)	0%

In den untersuchten Proben von Patient 7 zeigten sich ähnliche Ergebnisse. Von der Probe hu 3542 konnten 10 Klone erfolgreich sequenziert werden, wobei alle 10 die Mutation C592G trugen. Die zudem in der Pyrosequenzierung ermittelte Mutation im Codon 594 fand sich in keinem der Klone wieder. Die Probe hu 3546 konnte neun Mal erfolgreich kloniert und die Klone sequenziert werden. Dabei trugen drei der neun Klone die Mutation C592G, bei den sechs anderen Klonen erfolgte der Nachweis der Punktmutation A594V.

Insgesamt war in keiner der analysierten Proben durch die Klonierung eine Doppelmutation eines einzelnen Virusstammes nachzuweisen, alle Klone wiesen entweder eine einfache Mutation eines Codons auf oder zeigten den Wildtyp.

#### 4.6 Mutationssuche im ORF UL54 mittels PCR und Sanger-Sequenzierung

Die Amplifizierung des ORFs UL54 erfolgte mit Hilfe einer Long-Distance PCR in drei Stufen. Zunächst wurde dabei Patientenmaterial mit hoher Viruslast amplifiziert. Darunter sowohl Proben, bei denen mit Hilfe der PSQ bereits Mutationen im ORF UL97 gefunden wurden, als auch solche, die trotz steigender Viruslast in der vorangegangenen Pyrosequenzierung mutationsfrei waren. Von 42 Ansätzen konnten 28 Proben erfolgreich amplifiziert werden. Die PCR-Produkte wurden anschließend mit Hilfe von neun verschiedenen Sequenzierprimern nach Sanger sequenziert.

Zunächst erfolgte ein Abgleich der erhaltenen Sequenzen mit der Ulmer Datenbank für UL97 und UL54 Mutationen. Hierbei fanden sich neben einigen Polymorphismen keine bekannten Resistenz-assoziierten Mutationen. Im Anschluss erfolgte die detaillierte Auswertung der Sequenzen, um eventuelle Mutantenanteile von weniger als 50% im mischinfizierten Patientenmaterial aufzufinden. Eine Übersicht über die Codons, für die in der Literatur Resistenz-verursachende Mutationen vorbeschrieben waren, gibt Tabelle 1.2. im Kapitel 1.6.1.

Im untersuchten Patientenmaterial konnte unter Verwendung der Sanger-Sequenzierung keine dieser Mutationen nachgewiesen werden. In Tabelle 4.18 ist eine Übersicht der amplifizierten Proben und Sequenzierergebnisse dargestellt.

**Tab. 4.18 Übersicht der Sanger-Sequenzierung im ORF UL54, Patientenzuordnung und Viruslast der untersuchten Proben**

*WT: Wildtyp*

Patient	Probe	Kopien/ml TaqMan	Sanger-Ergebnis für Resistenz-assoziierte Mutationsloci	stumme Mutationen
2	hu 3588	8.500	PCR negativ	-
	hu 3589	29.900	PCR negativ	-
	hu 3590	1.156.640	WT	A809A (100%), A987A (90%)
	hu 3591	340	PCR negativ	-
	hu 3593	676.240	WT	A809A (80%), A987A (85%)
	hu 3595	2.146.440	WT	A809A (85%)
3	hu 3684	2.480	PCR negativ	-
	hu 3685	4.920	PCR negativ	-
	hu 3686	9.720	PCR negativ	-
	hu 3687	17.540	WT	A809A (100%)
	hu 3688	14.380	WT	A809A (95%)
	hu 3689	45.560	PCR negativ	-
4	hu 3559	3.120	PCR negativ	-
	hu 3560	6.920	PCR negativ	-
	hu 3561	0	PCR negativ	-

	hu 3562	12.480	PCR negativ	-
	hu 3563	0	PCR negativ	-
	hu 3564	3.180	WT	A809A (100%), A987A (100%)
5	hu 3579	293.500	WT	P522P (45%), V781V (30%), A809A (45%), T821T (40%), A987A (40%)
	hu 3580	318.080	WT	A987A (30%)
	hu 3581	142.440	WT	A987A (50%)
	hu 3582	73.660	WT	V781V (40%), V812V (40%)
	hu 3583	77.700	PCR negativ	-
	hu 3584	63.780	WT	V781V (40%)
7	hu 3531	114.540	WT	-
	hu 3532	1.223.520	WT	-
	hu 3533	916.180	WT	-
	hu 3534	71.840	WT	-
	hu 3542	80.940	WT	-
	hu 3543	76.820	WT	-
	hu 3544	96.280	WT	-
	hu 4160	17.000 (Charité)	WT	-
hu 4161	52.000 (Charité)	WT	-	
8	hu 3715	63.240	WT	A809A (100%), A987A (100%)
	hu 3716	93.320	PCR negativ	-
	hu 3718	63.040	WT	A809A (100%)
9	hu 3964	87.640	WT	A809A (90%)
11	hu 3979	1.144.700	WT	A809A (100%)
	hu 3980	4.147.800	WT	A809A (100%)
	hu 3981	1.596.580	WT	A809A (100%)
	hu 3982	468.140	WT	A809A (100%)
13	hu 4003	82.620	WT	A809A (100%)

#### 4.7 Probenanalyse mittels Next Generation Sequencing (NGS)

Nach Auswertung der mittels Sanger- und Pyrosequenzierung erhaltenen Ergebnisse folgte die zusätzliche Analyse ausgewählter Proben mit Hilfe eines Verfahrens des Next Generation Sequencing. Konkret wurde in dieser Arbeit der Roche 454 von *Life Sciences* verwendet. Geklärt werden sollte, ob sich diese Mutationen auch mit Hilfe des dritten Verfahrens bestätigen ließen, und wenn ja, zu welchem Zeitpunkt sie mit Hilfe des NGS erstmals detektiert werden können. Hierzu erfolgte zunächst das Design der benötigten Fusionsprimer, wobei jede Probe zunächst mit je sechs Primerpaaren amplifiziert wurde. Eine Übersicht über die dabei verwendeten Assays und den mit ihnen analysierten Genomabschnitten zeigt Tabelle 4.19.

**Tab. 4.19 NGS-Assays und die zugehörigen Genomabschnitte im ORF UL97**

Assay	Primerpaar	Fragmentgröße (bp)	Genomabschnitt (Codon)	Position (Zielcodon)
1	460_1F_MID1-6 / 460_1R_MID1-6	360	370-489	460
2	460_2F_MID1-6 / 460_2R_MID1-6	358	425-544	460/520
3	520_1F_MID1-6 / 520_1R_MID1-6	331	446-561	460/520
4	520_2F_MID1-6 / 520_2R_MID1-6	362	493-613	520/592-607
5	600_1F_MID1-6 / 600_1R_MID1-6	338	554-666	592-607
6	600_2F_MID1-6 / 600_2R_MID1-6	335	563-674	592-607

#### 4.7.1 NGS von Patientenproben

Mit Hilfe der NGS-Assays wurden sechs ausgewählte Proben von Patient 3 sequenziert, von denen zum einen genügend Restmaterial zur Verfügung stand und in denen zum anderen im Vorfeld mittels Sequenzanalyse nach Sanger- sowie in der Pyrosequenzierung zu unterschiedlichen Zeitpunkten Resistenz-assoziierte Mutationen im ORF UL97 nachgewiesen werden konnten. Als Mutationsnachweis in der NGS galten Messwerte, die oberhalb der in der Literatur festgesetzten Nachweisgrenze lagen. Tabellen 4.20-4.25 zeigen einen Überblick über die mittels NGS in den Proben detektierten Mutationen, wobei neben den bekannten acht häufigsten Resistenz-assoziierten Mutationen auch solche aufgelistet sind, die bei der Analyse zufällig ins Bild traten und deren Relevanz in Bezug auf eine herabgesetzte GCV-Wirksamkeit nicht geklärt ist. Keine dieser unbekanntenen Mutationen konnte trotz Mehrfachabdeckung der betreffenden Genomabschnitte durch die verwendeten Assays wiederholt nachgewiesen werden.

**Tab. 4.20 NGS-Ergebnisse für Probe hu 3676 (Tag 36)**

Mutation Assay (Codon)	Mutation									Sonstige
	M460I	M460V	H520Q	C592G	A594V	L595F	C603W	D605E	C607Y	
1 (370-489)	0%	0%								K444R (100%)
2 (425-544)	0%	0%	0%							D441G (37,5%), C449G (37,5%)
3 (446-561)	0%	0%	0%							I474T (12,7%), V498A (1,2%), F540L (1,9%), P541S (1,8%)
4 (493-613)			0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	-
5 (554-666)				0%	0%	0%	0%	0%	0%	-
6 (563-674)				0%	0%	0%	0%	0%	0%	L567P (1,7%), L661P (1,7%)
Mittelwert										

**Tab. 4.21 NGS-Ergebnisse von Probe hu 3679 (Tag 47)**

Mutation Assay (Codon)	M460I	M460V	H520Q	C592G	A594V	L595F	C603W	D605E	C607Y	Sonstige
1 (370-489)	0%	0%								F414L (1,8%)
2 (425-544)	0%	0%	0%							-
3 (446-561)	0%	0%	0%							-
4 (493-613)			0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	-
5 (554-666)				0%	0%	0%	0%	0%	0%	L584P (1,7%), M660I (1,7%)
6 (563-674)				0%	0%	0%	0%	0%	0%	-
Mittelwert										

**Tab. 4.22 NGS-Ergebnisse von Probe hu 3687 (Tag 111)**

Mutation Assay (Codon)	M460I	M460V	H520Q	C592G	A594V	L595F	C603W	D605E	C607Y	Sonstige
1 (370-489)	0%	0%								S431G (1,6%)
2 (425-544)	0%	0%	0%							F454L (1,5%)
3 (446-561)	0%	0%	0%							N510D (1,1%)
4 (493-613)			0%	0%	0%	11,7%	86,1%	0%	0%	R524Q (4,3%), L573P (4,7%)
5 (554-666)				0%	8,5%	28,7%	62,7%	0%	0%	-
6 (563-674)				0%	7,6%	28,3%	64%	0%	0%	L673Y (99,5%)
Mittelwert					5,4%	22,9%	70,9%			

**Tab. 4.23 NGS-Ergebnisse für Probe hu 3965 (Tag 120)**

Mutation Assay (Codon)	M460I	M460V	H520Q	C592G	A594V	L595F	C603W	D605E	C607Y	Sonstige
1 (370-489)	0%	0%								-
2 (425-544)	0%	0%	0%							-
3 (446-561)	0%	0%	0%							-
4 (493-613)			0%	0%	21,1%	55,7%	22,2%	0%	0%	L528P (1,1%)
5 (554-666)				0%	0%	34,9%	64,1%	0%	0%	-
6 (563-674)				0%	0%	39,1%	50,6%	0%	0%	R593C (1,4%), E638G (2,6%)
Mittelwert					7,0%	43,2%	45,6%			

**Tab. 4.24 NGS-Ergebnisse von Probe hu 3967 (Tag 124)**

Mutation Assay (Codon)	M460I	M460V	H520Q	C592G	A594V	L595F	C603W	D605E	C607Y	Sonstige
1 (370-489)	0%	0%								C453R (5,1%), F445S (5,1%), H469R (1,3%), C480R (1,1%)
2 (425-544)	0%	0%	0%							K443E (1,4%)
3 (446-561)	0%	0%	0%							-
4 (493-613)			0%	0%	0%	38,7%	59,7%	0%	0%	R507H (11,6%), V496A (2,8%)
5 (554-666)				0%	16,0%	57,8%	25,4%	0%	0%	V576A (5,5%), R593H (5,3%)
6 (563-674)				0%	0%	40,7%	53,7%	0%	0%	L661P (1%)
Mittelwert					5,3%	45,7%	46,3%			

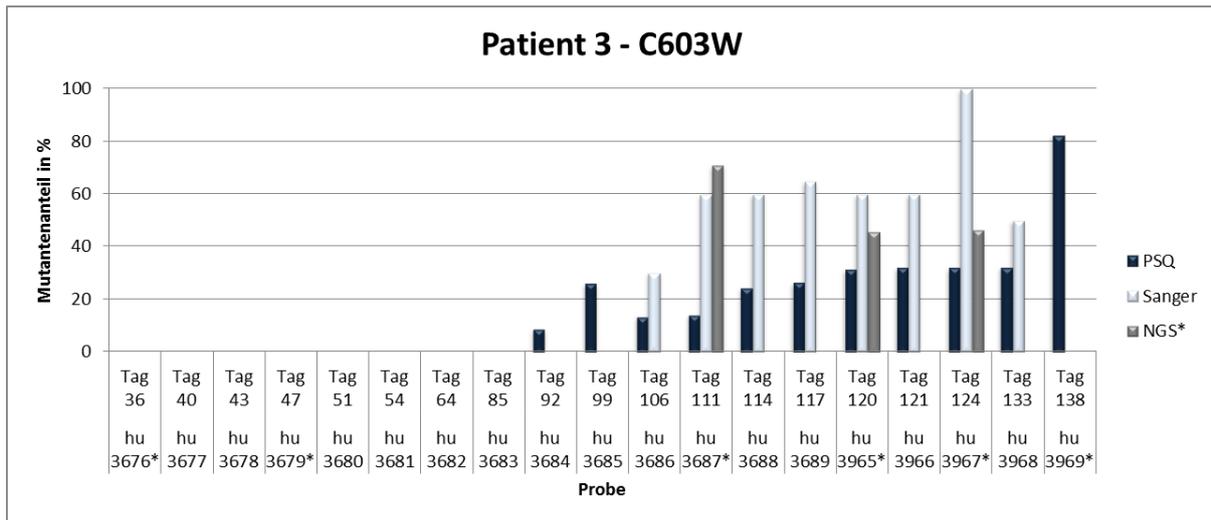
**Tab. 4.25 NGS-Ergebnisse von Probe hu 3969 (Tag 138)**

Mutation Assay (Codon)	M460I	M460V	H520Q	C592G	A594V	L595F	C603W	D605E	C607Y	Sonstige
1 (370-489)	0%	0%								-
2 (425-544)	0%	0%	0%							C534R (1,2%)
3 (446-561)	0%	0%	0%							H513Y (2,1%)
4 (493-613)			0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	-
5 (554-666)				0%	0%	99,5%	0%	0%	0%	-
6 (563-674)				0%	0%	100%	0%	0%	0%	L673Y (100%)
Mittelwert						66,5%				

Nach Herstellerangaben erlaubt die Amplicon-Sequenzierung mit dem Roche 454 die Detektion minoritärer Varianten in Mischpopulation mit einer Nachweisgrenze von <1% (<http://454.com/applications/targeted-resequencing/index.asp>). In der Literatur werden für das NGS von HCMV, abhängig vom verwendeten Assay sowie von der Genomkopienzahl, Sensitivitätsgrenzen zwischen 1-10% beschrieben (Sahoo 2013, St. John et al. 2016). Aufgeführt sind daher alle Mutationen, die mit einem Anteil von >1% detektiert wurden. Auffallend sind die hohen Anteile der Resistenzmutanten L595F und C603W, welche mit Hilfe der NGS erstmals in Probe hu 3687 von Tag 111 nach Transplantation nachgewiesen werden konnten. Die Proben zwischen Tag 47 (hu 3679) und Tag 111 (hu 3687) nach TX konnten aufgrund des aufgebrauchten Patientenmaterial keiner Analyse mittels NGS unterzogen werden.

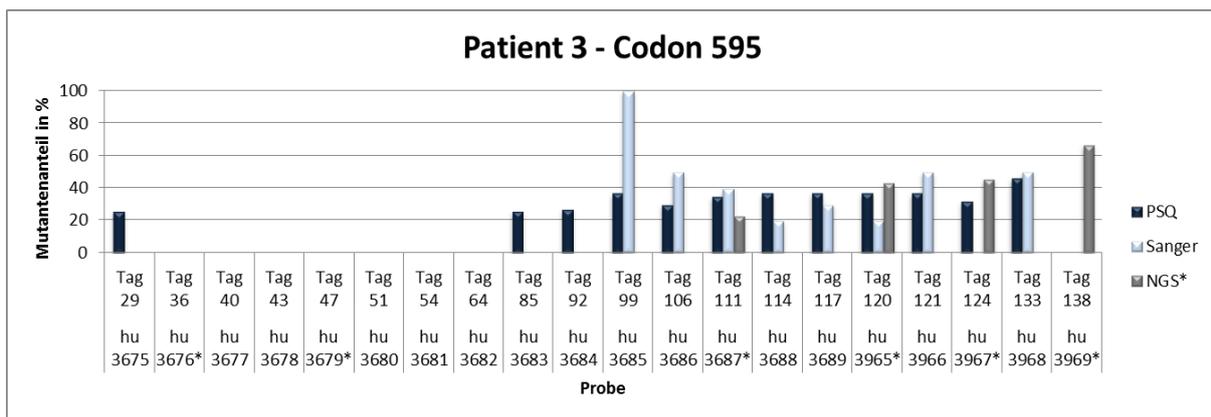
#### 4.8 Vergleich der NGS-Ergebnisse mit denen aus PSQ und Sanger

Die mittels Sanger-Sequenzierung und PSQ nachgewiesenen Mutationen in den untersuchten Proben von Patient 3 ließen sich auch mit Hilfe der Amplicon-Sequenzierung nachweisen. So fand sich in der Probe 3965 von Tag 120 nach Transplantation sowohl die Mutante L595F, als auch die C603W in signifikanten Anteilen. Ein zeitlich vor dem Erstauftreten in der PSQ gelegener Nachweis einer der Mutationen gelang nicht. Dabei konnten die Proben zwischen Tag 47 und 111 nach TX aufgrund des bereits aufgebrauchten Materials nicht mit Hilfe der Amplicon-Sequenzierung analysiert werden. Abbildung 4.11 und 4.12 geben einen Überblick über die erhaltenen Mutantenanteile in Codon 603 und 595 der untersuchten Proben in allen drei Verfahren.



**Abb. 4.11 Grafische Darstellung mittels Sequenzanalyse in PSQ, Sanger und NGS ermittelten Mutantenanteile für Codon 603**

*\* die markierten Proben wurden mit Hilfe der NGS Assays 1-6 analysiert, dargestellt ist der errechnete Mittelwert der jeweils erhaltenen Mutantenanteile*



**Abb. 4.12 Grafische Darstellung mittels Sequenzanalyse in PSQ, Sanger und NGS ermittelten Mutantenanteile für Codon 595**

*\* die markierten Proben wurden mit Hilfe der NGS Assays 1-6 analysiert, dargestellt ist der errechnete Mittelwert der jeweils erhaltenen Mutantenanteile*

In der Amplicon-Sequenzierung der Proben hu 3687, hu 3965 und hu 3969 ließ sich zudem wiederholt die Mutante A594V nachweisen, welche in der PSQ mit Mutantenanteilen von 5,6 – 9,5% und in der Sanger-Sequenzierung einmalig in Probe hu 3965 mit etwa 20% nachgewiesen wurde.

## 5 Diskussion

HCMV-Infektionen spielen insbesondere bei Säuglingen und immunsupprimierten Patienten nach Organ- oder Stammzelltransplantationen eine Rolle. Bleiben sie unbehandelt oder schlägt eine antivirale Therapie nicht an, kommt es zu schweren Komplikationen, die letztlich zur Abstoßung des Transplantates oder gar zum Tod des Patienten führen können. Die Bedeutung einer Resistenztestung ist groß, um betroffene Patienten rechtzeitig effektiv behandeln zu können. Aufschluss über eine tatsächliche Resistenzentwicklung als Ursache eines Therapieversagens geben virologische Methoden.

Als Nachweisverfahren zur Detektion GCV-resistenter HCMV-Stämme stehen heute sowohl phänotypische als auch genotypische Methoden zur Verfügung. Je nach Fragestellung ergeben sich Vor- und Nachteile der verschiedenen Verfahrensansätze. Goldstandard zur phänotypischen Resistenztestung eines Virus-Stammes gegenüber einem Virostatikum ist die Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC50) des Wirkstoffes mit Hilfe des Plaquereduktionstests. Er dient ebenfalls zur Ermittlung des Effektes einer mittels genotypischer Verfahren neu detektierten Mutation auf die Suszeptibilität gegenüber dem Therapeutikum. Vorteile sind die hohe Spezifität und Empfindlichkeit solcher Tests. Jedoch sind sie in ihrer Durchführung aufwendig und zeitintensiv. Hinzu kommt eine mangelnde Standardisierbarkeit, die die Vergleichbarkeit der Testergebnisse erschwert. Durch die Notwendigkeit der Kultivierung des Virus *in vitro* haben zudem zwei weitere Faktoren Einfluss auf das Ergebnis. Zum einen kann es bei Anzucht in Abwesenheit des Virostatikums zu einem Selektionsvorteil des Wildtyps gegenüber der resistenten Mutante kommen (Gilbert et al 2002), zum anderen bleibt der Einfluss einer *in vivo* zur Resistenz führenden Mutation *in vitro* ggf. unentdeckt, wenn der Anteil der Resistenz-tragenden Subpopulation in der zu testenden Mischpopulation im Patientenmaterial von vornherein zu gering ist und der Schwellenwert der IC50 zur Abgrenzung einer Resistenz nicht erreicht wird. Mit genotypischen Nachweisverfahren kann eine Resistenztestung unabhängig von einer vorherigen Viruskultivierung direkt aus Patientenmaterial erfolgen. Ergebnisse liegen daher schon wenige Stunden später vor und bilden die *in vivo* herrschenden quantitativen Verhältnisse besser ab. Klinisch bedeutet ein schnellerer Resistenznachweis die Möglichkeit einer zeitnahen Anpassung der antiviralen Therapie und damit einhergehend einer Verbesserung des Outcomes. Um bereits bekannte Resistenz-assoziierte Mutationen nachzuweisen haben sich daher erste genotypische Verfahren in der klinischen Routinediagnostik etabliert. Die Möglichkeiten und Grenzen dieser Methoden in der Diagnostik von GCV-resistenten HCMV-Stämmen sollten in

dieser Arbeit bewertet werden. Der Fokus lag hierbei insbesondere auf der frühzeitigen molekulargenetischen Detektion kleiner Resistenz-assoziiierter HCMV-Stämme in Mischpopulationen. Konkret wurden dazu 180 Patientenproben im zeitlichen Verlauf nach erfolgter Transplantation mit drei verschiedenen Sequenziermethoden (Sanger, PSQ und NGS) auf das Vorhandensein von Resistenz-assoziierten Mutationen untersucht. Allen genotypischen Nachweismethoden ist die Notwendigkeit der DNA-Extraktion vor der möglichen Analyse gemein. Kommt es hierbei zu Kontaminationen, können diese die weiteren Ergebnisse erheblich verfälschen. Um entsprechende Verunreinigungen frühzeitig zu erkennen ist daher das Mitführen von Negativkontrollen unerlässlich.

### **5.1 Genotypische Verfahren zur Detektion Resistenz-assoziiierter Mutationen im ORF UL 97**

Zur Analyse des ORF UL 97 sind derzeit vor allem PCR-basierte Verfahren etabliert. Neben der klassischen Sequenzierung nach Sanger mit vorgeschalteter PCR, finden heute zunehmend neue Methoden, wie Pyrosequenzierung und Ansätze des Next Generation Sequencing, Anwendung. Des Weiteren kann auch mit Hilfe verschiedener Real-time PCR Assays, durch den Einsatz von *LightCycler*-Sonden und anschließender Schmelzkurvenanalyse (Göhring et al. 2008), auf die zu analysierende Sequenz geschlossen werden. Der Nachteil hierbei liegt zum einen in der Beeinflussbarkeit der Schmelzkurven durch mutationsstellennahe Polymorphismen, zum anderen kann nicht zwischen verschiedenen Mutationen, die dasselbe Codon betreffen, differenziert werden. Dessen ungeachtet können mit diesem Verfahren auch Proben mit sehr geringer Viruslast ohne vorherige Anzucht in Zellkultur amplifiziert werden. Zudem liegen bereits nach wenigen Stunden auswertbare Ergebnisse vor.

Dabei steht neben einer hohen Sensitivität und Spezifität der einzelnen Methoden auch zunehmend die wirtschaftliche und zeitliche Effizienz im Vordergrund. So zeichnet sich die Sanger-Sequenzierung insbesondere durch die Erfassung eines breiten Mutationsspektrums aus. Neben einzelnen Resistenz-assoziierten Punktmutationen lassen sich auch Deletionen nachweisen. Nachteilig ist jedoch ihre geringe Sensitivität bei der Quantifizierung geringer Mutantenanteile in Mischpopulationen sowie die vergleichsweise geringe Datenmenge pro Sequenzierlauf.

Mit der Erkenntnis, dass bereits Mutantenanteile von 5-10% in einer Gesamt-HCMV-Population einen Anstieg der IC50-ratio über den Sensibilitäts-Schwellenwert für GCV bedingen kann (Eckle et al. 2004), gewann der Aspekt der Detektion geringer Resistenz-tragender

Subpopulationen zunehmend an Bedeutung. Dabei liegt die Nachweisgrenze für minoritäre Populationen im Verfahren nach Sanger bei etwa 20% (Castor 2007), während für die verwendeten Assays der Pyrosequenzierung eine Nachweisgrenze von etwa 6% ermittelt wurde (Schindele et al. 2010). Für aufkommende Methoden des Next Generation Sequencing wurde sogar eine Nachweisgrenze von 1-3% beschrieben (Chou 2015, Sijmons 2014). Steht der sensitive Nachweis geringer Anteile mutierter HCMV-Stämme in einer Gesamtviruspopulation im Vordergrund sind gegenüber konventioneller Sanger-Sequenzierung Real-time-PCR-Assays, die sich durch ihre schnelle Durchführbarkeit innerhalb weniger Stunden auszeichnen (Göhring et al. 2008, Yeo et al. 2005), ebenso wie die Pyrosequenzierung (Benzi et al. 2012) besser geeignet. Im Vergleich zur konventionellen Sequenzierung nach Sanger ist die PSQ nicht nur schneller und günstiger, sie erlaubt zudem die parallele Analyse von bis zu 96 Sequenzen in einem Sequenzierlauf. Nachteilig ist jedoch die Limitation der zu analysierenden Amplifikatlänge. Jede Längenzunahme geht mit einer schlechteren Immobilisierbarkeit und somit Separation des zu analysierenden Doppelstrangs während des Sequenziervorgangs einher (O'Meara 2001). Da die derzeit bekannten Resistenz-assoziierte Mutationen im HCMV-Genom in zwei relativ kurzen Abschnitten der ORFs UL 97 und UL 54 auftreten, sind sie sowohl für die Pyrosequenzierung als auch für verschiedene Anwendungen des Next Generation Sequencing (NGS) gut zugänglich (Sahoo et al 2013). Verschiedene Anwendungsstudien bei der Mutationsdetektion resistenter HIV-Stämme konnten auch für NGS einen Vorteil gegenüber Sanger bei der Detektion geringer Mutantenanteile in Mischpopulationen nachweisen. Etwa die Hälfte der mittels NGS detektierten Mutationen im HIV-Genom wurde dabei im Verfahren nach Sanger übersehen (Simen et al. 2009, Le et al. 2009, Lataillade et al. 2010). Von Vorteil ist zudem die hohe Durchsatzrate des NGS, durch die sich sowohl der zeitliche als auch finanzielle Aufwand bei der Detektion von Resistenzen senken lässt (Sijmons 2014).

Eine Schwäche der Methode lag in der Amplifikation klinischer Proben mit geringer Viruslast. So missglückte in Untersuchungen von Sahoo et al. beispielsweise die Amplifikation von Patientenproben mit einer Viruslast < 2400 Kopien/ml (Sahoo et al. 2013). Zudem zeigten sich bereits in Versuchen mit Plasmidmischungen von unter 1000 Kopien/ml deutliche Abweichungen der beobachteten Anteile untergeordneter Subpopulationen im Vergleich zum erwarteten Ergebnis (Sahoo et al 2013). Ferner erfordert NGS eine spezielle Vorbereitung der Proben. Für den Sequenzierlauf und die anschließende Datenauswertung werden einige Tage Zeit und verhältnismäßig teure Hardware benötigt, so dass sie als kosteneffektive und schnelle Alternative in der Routinediagnostik noch ungeeignet scheint (Schindele et al. 2010).

## 5.2 Einfluss der Genomkopienzahl im Ansatz auf die Ergebnisse der PSQ

Die Ermittlung der Gesamtgenomkopienzahlen im untersuchten Probenmaterial erfolgte mit Hilfe einer Real-time PCR, deren Sensitivitätsgrenze, unter der die Detektion minoritärer Mutantenanteile nicht möglich ist, auf etwa 10 Kopien/Ansatz geschätzt wurde. Ferner wurde durch L.Apelt, basierend auf den Assay-internen Hintergrundsignalen in der PSQ, eine Mutanten-Nachweisgrenze von 6% festgelegt. Hieraus ergibt sich rechnerisch eine Mindest-Genomkopienzahl von 167 im Ansatz, um einen Mutantenanteil von 6% detektieren zu können. Entsprechend erhöht sich die Nachweisgrenze, je niedriger die Kopienzahl im eingebrachten Ansatz ist.

In Proben mit geringer Viruslast ist die Genomkopienzahl klein. Dies kann im Falle der vorliegenden HCMV-Mischpopulationen dazu führen kann, dass einzelne Subpopulationen im Ansatz über- oder unterrepräsentiert vorliegen. Dies spiegelt sich dann in den Ergebnissen der Sequenzierung wider. Hinzu kommen Unterschiede in der Effizienz beim Primerannealing sowie zufällige Ereignisse in den ersten Durchgängen der PCR, die zu einer variablen Amplifikation einzelner Subpopulationen führen können. Ergebnis ist ein PCR-Produkt, welches ggf. nicht der repräsentativen Verteilung einzelner Virusstämme im Patientenmaterial entspricht. Insbesondere zu geringen Anteilen vertretene Subpopulationen scheinen anfällig für solche Methodenfehler (Sahoo 2013). Gleiches gilt ebenfalls für die auf der PSQ basierenden Methoden des NGS (Tsibris 2009, Jabara 2011).

So konnte in der der PSQ vorgeschalteten PCR aus 35 von 180 Proben (19,4 %) virale DNA amplifiziert werden, die in der TaqMan ohne Amplifikat blieben oder nur sehr geringe Kopienzahlen aufwiesen, wie beispielsweise hu 3968 von Patient 3 oder hu 3971 und hu 3973 von Patient 10. Zum Teil wurden in diesen Proben mit Hilfe der Pyrosequenzierung Resistenz-assoziierte Mutationen nachgewiesen (hu 3558 von Patient 4, hu 3974 von Patient 10). Da es sich insbesondere bei diesen Ergebnissen um Einzeldetektionen ohne erneutes Auftreten in weiteren zeitlichen Verlaufskontrollen handelt, ist in diesen Fällen entweder von einer Kontamination auszugehen, oder aber es sind o.g. Phänomen der nicht repräsentativen Verteilung im Amplifikat bei geringer Viruslast zum Tragen gekommen. Auch die analysierten Proben von Patient 10 (hu 3970 – hu 3974) wiesen in der TaqMan nur äußerst geringe Kopienzahlen auf. Jedoch ließ sich die Resistenzmutante C603W in den Proben ab Tag 41 nach Transplantation mittels PSQ wiederholt zu hohen Anteilen detektieren, so dass hier auch im Vergleich mit den Ergebnissen der Sanger-Sequenzierung, in denen ein Mutantenanteil von

100% ermittelt wurde, von einer realistischen Abbildung der tatsächlichen Verteilungsverhältnisse oder gar von einer Unterrepräsentation auszugehen ist. Insgesamt lag die Kopienzahl bei mehr als der Hälfte der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proben unterhalb von 167 pro Ansatz. Dennoch ließen sich mit Hilfe der Pyrosequenzierung größtenteils verwertbare Ergebnisse erzielen. Bezogen auf die oben aufgeführte Berechnung, stellt sich die Frage ob die ermittelte Nachweisgrenze weiterhin aktuell ist. Möglicherweise muss aber auch ein Messfehler in der Real-time PCR erwogen werden. So könnte ein ggf. fehlerhafter Standard zum Erhalt falscher Kopienzahlen geführt haben. Geht man weiterhin von der bisherigen Nachweisgrenze aus, erscheint eine Bewertung etwaiger Mutantenanteile in Proben mit einer Gesamtkopienzahl  $< 167$  pro Ansatz wenig zielführend.

### **5.3 Korrelation der PSQ-Ergebnisse mit klinischen Verlaufsdaten**

Da das Auftreten Resistenz-assoziiierter Mutationen im HCMV-Genom mit der zeitlichen Exposition gegenüber GCV ansteigt, empfehlen aktuelle Richtlinien im Umgang mit CMV bei Patienten nach Organtransplantation die Durchführung einer Resistenztestung nach mindestens sechswöchiger antiviraler Therapie, die über zwei oder mehr Wochen in voller Dosierung erfolgt ist (Kotton 2013, Chou 2015). Dabei machen klinische Verschlechterungen oder extrem hohe Viruslasten eine frühzeitigere genotypische Resistenzdiagnostik erforderlich.

Entscheidendes Maß für das Resistenzpotenzial einer Mutation gegenüber GCV ist die Restphosphorylierungskapazität bzw. die IC50-ratio des mutierten HCMV-Stammes gegenüber dem Wildtyp. Dabei bedingt eine IC50-ratio von 5 oder mehr ein Resistenzpotenzial, welches aufgrund der in vivo maximal erreichbaren GCV-Konzentration als nicht mehr therapierbar gilt (Chou 2008). Alle in der PSQ untersuchten Mutationen erreichen oder überschreiten diesen Schwellenwert. Ausnahmen bilden häufige stumme, nicht Resistenz-assoziierte Punktmutationen in Codon 598, sowie Codon 605. Sie wurden mitbetrachtet, um den korrekten Ablauf der Sequenzierung nach den entsprechenden Codons zu gewährleisten.

Wie bereits unter 4.2. diskutiert, ist eine Interpretation der in der Pyrosequenzierung ermittelten Mutantenanteile von Subpopulationen nur in Relation zur Gesamtgenomkopienzahl im Probenmaterial sinnvoll. Eine vorherige Quantifizierung der Viruslast scheint daher unverzichtbar.

### **5.3.1 Patientenmaterial ohne relevanten Nachweis Resistenz-assoziiierter Mutationen**

Patient 1 und 6 zeigten klinisch ein gutes Ansprechen auf die präemptive Therapie mit Ganciclovir. Korrelierend zur sinkenden Viruslast konnte in der PSQ in den untersuchten Proben keine Resistenz-assoziierte Mutation im UL97-Genabschnitt nachgewiesen werden.

Bei Patient 9 wurde in den untersuchten Proben zwar eine steigende Viruslast detektiert, eine Resistenz-assoziierte Mutation konnte im Virusgenom jedoch nicht nachgewiesen werden. Eine virostatistische Medikation erfolgte ab Tag 17 nach Transplantation. Einschränkend muss ergänzt werden, dass das Blut des Patienten nur über einen vergleichsweise sehr kurzen Zeitraum untersucht wurde.

Ähnlich verhält es sich mit den untersuchten Proben von Patient 11 und 13. Auch hier wurde in keinem der untersuchten Codons eine Resistenz-assoziierte Mutation gefunden. Ob eine virostatistische Therapie mit GCV erfolgte ist für beide Fälle unklar.

### **5.3.2 Patientenmaterial mit vereinzeltem Mutationsnachweis**

In den untersuchten Proben von Patient 2 zeigte sich ein rapider Anstieg der Viruslast unter der präemptiven antiviralen Therapie mit Ganciclovir, die auch unter der durch Zunahme von Foscavir eskalierten Therapie weiter stieg. Klinisch lag der Verdacht auf eine Resistenzentwicklung eines HCMV-Virusstammes nahe. In der PSQ erfolgte die Detektion eines Basenaustausch in Codon 605 mit hohen Mutantenanteilen, der laut Literatur jedoch keine Resistenzentwicklung verursacht (Chou 2008, Kotton 2013). Zudem zeigten sich mit geringen Mutantenanteilen vereinzelt die Mutationen M460V, C592Q, A594V und L595S, von denen die Erstgenannte in allen untersuchten Proben mit nachweislich hoher Viruslast (hu 3588 – hu 3595 ausgenommen hu 3591) zu finden war. Bei einer angenommenen Nachweisgrenze der angewandten PSQ-Assays von 6% Mutantenanteil sind die erhaltenen Werte als signifikant zu bewerten. Vermutlich verhinderte die Zugabe von Foscavir ein weiteres Wachstum des mutierten Virusstammes. Jedoch lässt der hierunter erneute Anstieg der Viruslast die zusätzliche Entwicklung einer Resistenzmutante im ORF UL54 vermuten, die eine Kreuzresistenz gegenüber Foscarnet bedingt haben könnte.

Im Probenmaterial von Patient 4 ließen sich in der PSQ vereinzelte Mutationen in Proben ohne Virusnachweis in der TaqMan detektieren (hu 3556, hu 3558), so dass hier von einer Kontamination oder ggf. einer Fehlmessung/Fehlinterpretation des Hintergrundsignals bei der PSQ ausgegangen werden muss.

In den untersuchten Proben von Patient 5 finden sich jeweils vereinzelt ein Nachweis der Mutanten A594V und L595S in der Probe hu 3568 von Tag 30 nach Transplantation. Zu diesem Zeitpunkt wurde der Patient seit zwei Tagen mit Ganciclovir behandelt, die Viruslast war stets gering. Da eine Resistenzentwicklung nach so kurzzeitiger virostatischer Therapie unwahrscheinlich scheint und die Mutationen im zeitlichen Verlauf nicht erneut auftraten, lag wahrscheinlich eine Fehlmessung/Kontamination den Messwerten zugrunde. Aufgrund einer ausgeprägten Leukopenie unter GCV erfolgte an Tag 37 nach TX eine Therapieumstellung auf Foscarnet und zwei Tage später die Deeskalation auf Valganciclovir. Die Viruslast blieb zunächst gering. In der Probe hu 3579 von Tag 99 war erneut ein deutlicher Anstieg der Viruslast zu verzeichnen, so dass am Folgetag die Medikation mit Foscarnet erneut aufgenommen wurde. Auffällig ist der im Verlauf seit Tag 63 nach TX wiederholte Nachweis der Resistenzmutante C592G in Proben mit hoher Genomkopienzahl. Diese liegt in Mischpopulation zwar dauerhaft unter einem Anteil von 10%, könnte aber Ursache des erneuten Viruslastanstiegs sein. Unter der Therapie mit Foscavir konnte diese im Verlauf erneut suffizient gesenkt werden.

Patient 8 erhielt seit Tag 51 nach Transplantation eine präemptive Therapie mit Valganciclovir bei steigender Viruslast. Eine bereits vor Beginn der Therapie wiederholt nachweisbare Mutation im Codon 595 konnte unter der antiviralen Medikation eliminiert werden. Laut Literatur treten Resistenz-assoziierte Mutationen im ORF UL97 erst einige Wochen nach Beginn der Therapie mit GCV auf (Chou 2015). Ein eventuell früherer Einsatz einer virostatischen Therapie mit GCV oder ggf. auch Aciclovir in der Behandlung des Patienten ist nicht bekannt. Prinzipiell spricht die Elimination einer Resistenzmutante unter GCV für eine ausreichend hohe Wirkstoffkonzentration im Patientenblut, die auch die durch den Mutantenanteil erhöhte IC50 in Mischpopulation überstieg.

Im untersuchten Material von Patient 12 wurden Mutationen vereinzelt in den Proben hu 3995 von Tag 86 und hu 3998 von Tag 111 nach TX mit relativ geringen Genomkopienzahlen detektiert, konnten jedoch im weiteren zeitlichen Verlauf unter Abfalls der Viruslast unter die Nachweisgrenze nicht erneut nachgewiesen werden. Eine Erklärung könnte, neben einem weiterhin gewährleisteten Therapieansprechen, eine Überrepräsentation durch PCR-Amplifikation gewesen sein. Auch eine Kontamination der Proben ist jedoch letztlich nicht sicher auszuschließen.

### 5.3.3 Patientenmaterial mit signifikantem Mutationsnachweis

Vier Wochen nach Beginn einer prophylaktischen GCV-Therapie wurde im Blut von Patient 3 erstmalig CMV-DNA nachgewiesen. Die Medikation wurde zunächst beibehalten, bis an Tag 120 nach erfolgter Transplantation zwei Resistenzmutanten detektiert wurden. In den anschließenden Analysen der Proben mittels Pyrosequenzierung war bereits in den Proben von Tag 85 nach TX (hu 3683) die Mutation L595S nachweisbar, deren Anteil in der Mischpopulation sich unter laufender GCV-Therapie sukzessive steigerte. Hinzu kam die Mutation C603W, die erstmals im Patientenmaterial von Tag 99 nach TX (hu 3685) in signifikantem Anteil detektiert wurde. Erstere war 18 Tage nach Therapieumstellung auf Foscavir mittels PSQ nicht mehr nachweisbar. Zweitere hingegen konnte bis einschließlich Tag 138 nach TX mit steigendem Anteil nachgewiesen werden. Jedoch ist eine Überrepräsentation bei geringer Genomkopienzahl (unterhalb der Nachweisgrenze in der TaqMan) anzunehmen. Spätere Proben wurden bei Absinken der Viruslast unter die Nachweisgrenze und klinisch korrelierender Symptomfreiheit nicht auf das Auftreten von Resistenzmutanten untersucht.

Patient 7 wurde bereits vor der Transplantation erfolgreich mit GCV behandelt. Die Viruslast ließ sich unter der Therapie suffizient senken. Die mit Hilfe der Pyrosequenzierung analysierten Proben wiesen bis zum Zeitpunkt der Transplantation keine Resistenz-assoziierten Mutationen auf. Etwa einen Monat nach erfolgter Transplantation kam es jedoch zu einem erneuten Anstieg der Viruslast, woraufhin weitere zwei Monate später mit der erneuten Gabe von GCV begonnen wurde. Die Viruslast ließ sich erneut senken. Die Pyrosequenzierung wies bereits in der Probe hu 3537 von Tag 43 einen signifikanten Anteil der Resistenzmutanten C592G und A594V (Probe hu 3538) nach, deren Anteile unter laufender Therapie weiter anstiegen. Passend hierzu sank die Viruslast nicht unter die Nachweisgrenze. Klinisch scheint dennoch ein Ansprechen auf die virostathe Therapie verzeichnet worden zu sein, denn eine Umstellung erfolgte nicht. Eine Erklärung dieser diskrepanten Ergebnisse könnte in der bekannten starken Schwankung der GCV-Spiegel liegen, die vermutlich eine Resistenzentwicklung förderte. Bekannt ist auch, dass im Patientenmaterial von Tag 693, der außerhalb des in dieser Arbeit betrachteten Beobachtungszeitraums lag, erstmals auch mit dem Verfahren nach Sanger Resistenz-assoziierte Mutationen nachgewiesen wurden. Zum klinischen Verlauf, sowie zum weiteren Therapieregime fehlen Daten.

Bei Patient 10 konnte eine prophylaktische virostathe Therapie mit Ganciclovir nach 90 Tagen ohne Virusnachweis abgesetzt werden, musste jedoch sieben Monate nach der

Transplantation präemptiv wieder begonnen werden. Passend zum Anstieg der Viruslast nach antiviraler Vortherapie zeigte sich in der PSQ die Resistenz-assoziierte Mutante C603W mit konstant hohem Populationsanteil. Im weiteren Therapieverlauf wurden Mutationen auch in den Codons 594, 595 und 607 detektiert (hu 3974 von Tag 91 nach TX), deren Anteil ebenfalls die Nachweisgrenze in der Mischpopulation überstieg. Bei trotz Mutationsnachweis anhaltend geringer Viruslast wurde auf eine Therapieeskalation verzichtet. Zum weiteren klinischen und paraklinischen Verlauf nach Tag 91 liegen keine Daten vor.

#### 5.4 Vergleich der PSQ-Ergebnisse der Patientenproben mit Ergebnissen aus der Literatur

Insbesondere die acht mit Hilfe der angewandten PSQ-Assays analysierten Mutationen im ORF UL97 sind in der Literatur wiederholt als die wichtigste genetische Ursache einer Resistenzentwicklung gegenüber Ganciclovir ermittelt worden (Lurain 2010, Chou 2015). Mit Ausnahme der Mutante C592G, die eine Erhöhung der IC50-ratio um das 3-fache bedingt, verursachen sie eine erforderliche Dosiserhöhung von GCV um das Fünf- bis Fünfzehnfache, um das virale Wachstum um 50% zu reduzieren (Lurain 2010). Abbildung 4.1. vergleicht die Häufigkeiten im Auftreten der einzelnen Mutationen, wie sie in der Literatur in einem Review von Lurain 2010 beschrieben sind, mit den in dieser Arbeit ermittelten.

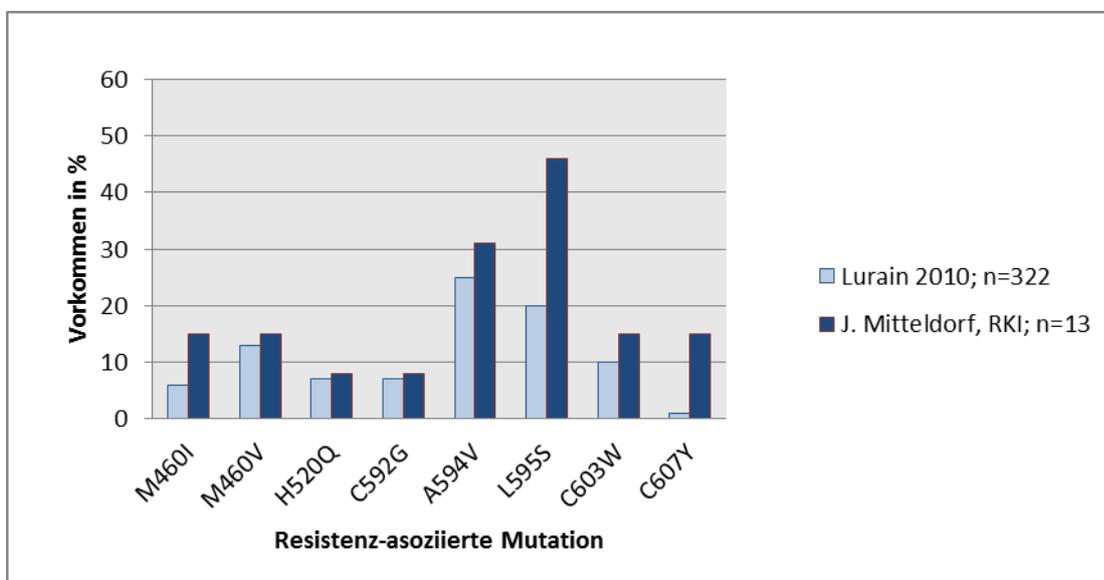


Abb. 5.1 Häufigkeiten ermittelter Mutationen im Vergleich zu in der Literatur beschriebenen Vorkommen

Mit Hilfe der PSQ wurden alle aus Lurain 2010 ausgewählten Mutationen in den untersuchten Patientenproben detektiert. Dabei kann es sich aufgrund der erheblichen Differenz in der Anzahl

der untersuchten Patientenfälle (Lurain 322, in dieser Arbeit 13) nur um einen orientierenden Vergleich handeln. Insgesamt korrelieren die ermittelten Häufigkeiten für die Mutationen M460V, H520Q, C592G, A594V und C603W in etwa mit den publizierten Angaben. Größere Abweichungen finden sich in den Vorkommen der Resistenzmutanten M460I, L595S und C607Y. Eine mögliche Erklärung könnte dabei in den angewandten Methoden der Resistenztestung liegen. Während die in der Literatur publizierten Häufigkeitsverteilungen mit Hilfe verschiedener genotypischer Nachweisverfahren ermittelt worden sind, beziehen sich die zum Vergleich verwendeten Daten dieser Arbeit ausschließlich auf die Ergebnisse der Pyrosequenzierung. Da die Mutantenanteile in den genannten Positionen in den hier untersuchten Patientenproben nur in Einzelfällen über 20% lagen, ist davon auszugehen, dass diese in der konventionellen Sanger-Sequenzierung nicht detektiert worden wären. Es ist anzunehmen, dass diese Mutanten tatsächlich häufiger vorkommen, als bisher bekannt. Allerdings muss angesichts der z.T. isolierten Nachweise der Mutationen in Einzelproben (M460I in Probe hu 3998 von Patient 12, L595S in hu 3558 von Patient 4, sowie in Probe hu 3568 von Patient 5 und C607Y in Probe hu 3995 von Patient 12, siehe Tabellen 3.6., 3.7. und 3.14. im Ergebnisteil), die ohne erneuten Nachweis in weiteren Verlaufsproben einzelner Patienten blieben, eine eventuelle Kontamination in Erwägung gezogen werden. Hinzu kommt ggf. eine Überrepräsentation minoritärer Mutantenanteile durch Amplifikationsphänomene in Proben mit geringer Gesamtgenomkopienzahl (hu 3995 und hu 3998 von Patient 12, hu 3557 von Patient 4, siehe Tabelle 4.1. (Ergebnisteil)).

## **5.5 Ergebnisvergleich mit Sanger**

Nach der erfolgreichen Sequenzierung nach Sanger wurden alle Proben zusätzlich mittels Pyrosequenzierung analysiert. Für die vollständige Durchführung beider Methoden war eine ausreichend große Menge der aus dem Patientenmaterial gewonnenen DNA erforderlich. Bei einigen Proben blieb bereits die der Sanger-Sequenzierung vorgeschaltete PCR negativ, so dass sich die nachgeschaltete Sequenzierung erübrigte. War im *LightCycler* zuvor Virus-DNA nachgewiesen worden, war nach Wiederholung der PCR die Amplifikation oftmals erfolgreich. Vereinzelt gelang jedoch keine Amplifikation. Bis auf Probe hu 3729 von Patient 8 und den Proben hu 3596, hu 3597 und hu 3607 von Patient 6 gelang indes die Amplifikation mit Hilfe der Pyro-PCR, was am ehesten durch eine geringfügig höhere Sensitivität der Pyro-PCR in der Amplifikation von Proben mit geringer Viruslast zurückzuführen ist, welche vermutlich aufgrund der vergleichsweise kurzen Fragmentlängen der Amplifikate zu erklären ist.

Aufgrund von vereinzelt aufgetretener PCR-Kontamination mussten zudem einige Sequenzierläufe wiederholt durchgeführt werden. Ziel war am Patientenmaterial aufzuzeigen, dass die Pyrosequenzierung der Methode nach Sanger im Hinblick auf die Detektion geringer Mutantenanteile in HCMV-Mischpopulation überlegen ist und sich so die Entstehung von Resistenzen im Therapieverlauf frühzeitiger erkennen lässt. Im Vorfeld wurde aufgrund einer ansteigenden oder persistierenden Viruslast unter virostatischer Therapie eine Resistenzentwicklung vermutet. Im Probenmaterial von 4/13 Patienten konnten signifikant Resistenz-assoziierte Mutationen mit beiden Methoden nachgewiesen werden.

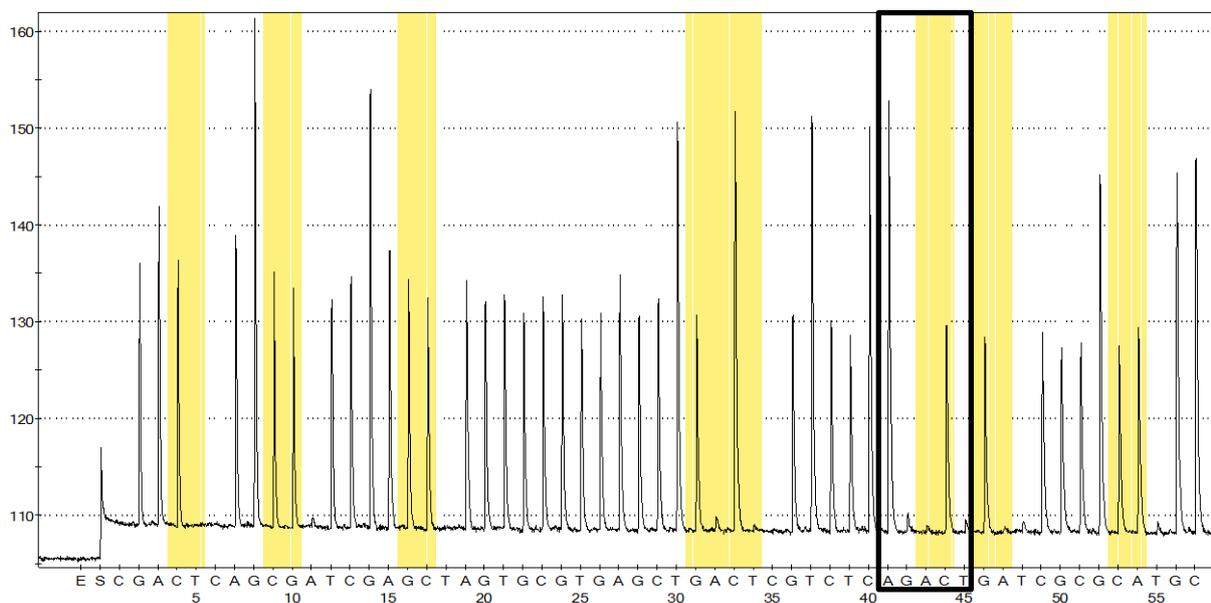
### **5.5.1 Patient 3**

Im zeitlichen Verlauf der untersuchten Proben konnte ein deutlich früherer Mutationsnachweis der Punktmutante C603W in der PSQ erzielt werden. Dabei lag der Anteil des Resistenz-tragenden Virusstammes in Mischpopulation zwischen 9-26% (hu 3684 - hu 3686) und stieg im Therapieverlauf weiter auf 82% (hu 3969) an. Mittels Sanger-Sequenzierung gelang der Mutationsnachweis in Codon 603 im zeitlichen Verlauf erst in Patientenmaterial, welches etwa drei Wochen nach dem ersten PSQ-Nachweis abgenommen worden war (hu 3686). Dabei wurde ein Mutantenanteil von etwa 60% detektiert. Ähnlich verhielt es sich mit der ebenfalls im Probenmaterial von Patient 3 detektierten Mutation L595F, die mittels Sanger-Sequenzierung erstmals in Probe hu 3685 von Tag 99 nach Transplantation nachgewiesen wurde. Der Anteil der Resistenz-tragenden Subpopulation lag in der Sequenzanalyse dieser Probe sogar bei 100%. Die Pyrosequenzierung hingegen wies im Codon 595 die zum Aminosäureaustausch von Leucin zu Serin führende Mutation L595S auf. Diese konnte bereits in Probe hu 3683 von Tag 85 nach TX nachgewiesen werden. Hier jedoch nur mit einem Anteil von 26%. In der Probe hu 3685 ist mittels Pyrosequenzierung ein Anstieg auf 37% ermittelt worden. Eine erstmalige Detektion erfolgte sogar bereits in Probe hu 3675 von Tag 29 nach TX, da es sich hier jedoch um ein Einzelergebnis handelt und der Mutantenanteil im Codon 595 in den nachfolgenden Proben unter der Nachweisgrenze lag, musste hier eine mögliche Kontamination angenommen werden.

#### **5.5.1.1 Ergebnisabweichung in Codon 595 zwischen Sanger und PSQ**

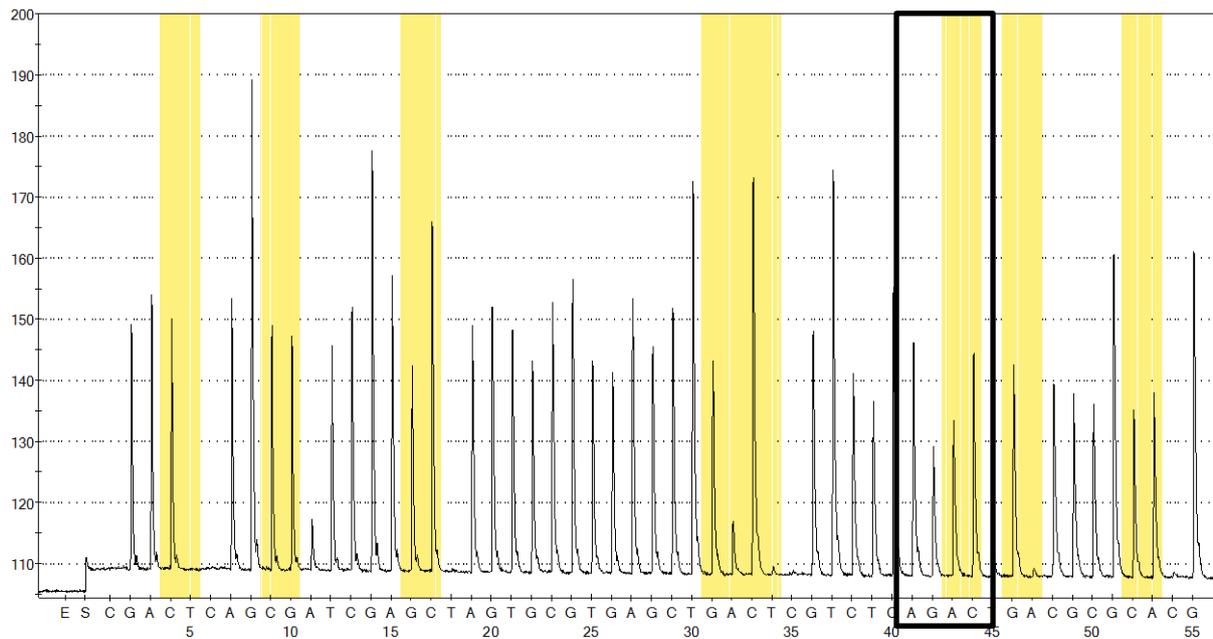
Die Ursache der erhaltenen Mutantenabweichung in Sanger (L595F) und PSQ (L595S) liegt an der im SNP Modus durchgeführten PSQ, genauer bei der im Assay 3 verwendeten Dispensionsreihenfolge. Hier wird zur Analyse von Codon 595 mit der Wildtyp-Sequenz TTG (im Pyrogramm komplementiert und revertiert CAA) zum Nachweis der gesuchten Mutante

L595S mit der Sequenz TCG (im Pyrogramm komplementiert und revertiert CGA) ein entsprechendes C ins System eingebracht. die Dispensionsreihenfolge lautet an dieser Stelle also T(C)G. Wird das C eingebaut, erkennt das System das entsprechend ausgesandte Fluoreszenzsignal, im Pyrogramm entsteht ein Peak für das zusätzliche C. In korrelierender Höhe vermindert sich der Peak für T, was als Mutation L595S gewertet wird. Kommt es im Codon 595 jedoch zu einer Basenabweichung mit dem Resultat eines Aminosäureaustausches von Leucin nach Phenylalanin mit der Sequenz TTC (im Pyrogramm komplementiert und revertiert GAA) steht zufällig auch hier das oben genannte C zur Verfügung. Im Pyrogramm zeigt sich weiterhin ein Peak für das zusätzliche C, jedoch ohne Einfluss auf die Höhe des Fluoreszenzsignals für das wie auch im Wildtyp zweifach eingebaute T. Da das System im SNP Modus diese Veränderung jedoch nicht deuten kann, erhält man zwar eine dem Basenaustausch entsprechende Prozentangabe für den detektierten Mutantenanteil, diese jedoch mit dem Hinweis „failed“. Bei genauerer Betrachtung der entsprechenden Peaks in den erhaltenen Pyrogrammen fällt die Mutation von TTG > TTC auf. Es handelt sich also auch in der PSQ eigentlich um die Mutante L595F.



**Abb. 5.2 Pyrogramm Assay 3 Wildtyp**

*Das Pyrogramm zeigt im markierten Bereich (Codon 595) die Wildtyp-Sequenz CAA (Leserichtung von rechts nach links)*



**Abb. 5.3 Pyrogramm von Probe hu 3685**

Das Pyrogramm zeigt im markierten Bereich (Codon 595) ein Mischbild aus der Wildtyp-Sequenz **CAA**, sowie der Mutante **GAA** (Leserichtung von rechts nach links)

### 5.5.2 Patient 7

Im Patientenmaterial von Patient 7 wurden über den zeitlichen Verlauf von 27 Monaten drei Resistenz-assoziierte Mutationen detektiert. Erstmals gelang ein signifikanter Nachweis der Punktmutation C592G mittels Pyrosequenzierung in der Probe hu 3537 von Tag 43 nach Transplantation mit 23%. Im weiteren Verlauf wurde sie mit einem maximalen Anteil von 62% (hu 3544 von Tag 104 nach TX) nachgewiesen. Im Sequenzierverfahren nach Sanger gelang der Nachweis der Mutante C592G ebenfalls in einer Probe von Tag 43 nach TX (hu 3538) mit einem Anteil von 30%. In oben genannter Probe hu 3537 konnte sie jedoch mittels Sanger-Sequenzierung nicht detektiert werden, wobei es sich bei dieser Probe um ein DNA-Extrat aus Patientenserum handelt, bei Probe hu 3538 lag Plasma als Ausgangsmaterial vor. Inwieweit es sich hier um eine Fehlerquelle handelt, ist jedoch im Nachhinein nicht sicher zu beurteilen. In der Pyrosequenzierung tauchte die Mutation im Codon 592 bereits in der vor Tag 43 nach TX entnommenen Probe von Tag 7 nach TX (hu 3536) auf. Aufgrund des großen zeitlichen Abstandes zwischen der Entnahme beider Proben lässt sich bei einem Anteil von 6,1% jedoch nicht sicher sagen, ob es sich hierbei wirklich um ein erstes Auftauchen der Mutante oder aber um reines Hintergrundsignal handelt. Inwieweit die Mutation mittels PSQ früher hätte signifikant detektiert werden können, lässt sich durch das fehlende Material aus dem Zeitraum

zwischen beiden Entnahmen nicht beurteilen.

Beide Methoden zeigen im weiteren Therapieverlauf einen Anstieg des mutierten Virusstammes auf. Wobei er in den Proben nach Tag 233 nach TX in der Sanger-Sequenzierung nicht mehr nachweisbar war, mittels PSQ jedoch weiterhin vereinzelt detektiert werden konnte.

Eine weitere Mutation im Patientenmaterial von Patient 7 wurde im Codon 594 ermittelt. Diese konnte mittels Pyrosequenzierung erstmals in der Probe hu 3537 von Tag 43 nach Transplantation mit einem Anteil von 8,5% nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf blieb ihr Anteil an der HCMV-Mischpopulation bei 8-31% und stieg in Probe hu 4160 von Tag 649 nach TX auf ein Maximum von 45% an. Dabei lag der Anteil der mutierten HCMV-Subpopulation in 12/15 Proben unterhalb der Nachweisgrenze der Sanger-Sequenzierung von 25%. Korrelierend dazu gelang die Detektion der Mutante A594V in der Methode nach Sanger in den Proben hu 4160 (PSQ: 45%, Sanger 40%) und hu 4161 von Tag 671 nach TX (PSQ: 39%, Sanger: 50%). In den Proben zwischen Tag 43 und Tag 649 nach TX ergab sich mittels Sanger-Sequenzanalyse kein Hinweis auf das Vorhandensein einer Mutante im Codon 594. Ausnahme bildet die Probe hu 3537, in der auch die Sangersequenz die Mutation A594V aufzeigt. Jedoch wurde in allen Proben, die im direkten zeitlichen Verlauf vor und nach hu 3537 untersucht wurden, in der Sanger-Sequenzierung 100% Wildtyp detektiert. Daher muss an dieser Stelle von einer Kontamination der Probe hu 3537 in der der Sanger-Sequenzierung vorgeschalteten PCR ausgegangen werden.

Als dritte Mutante wies die Pyrosequenzierung in den Patientenproben die Mutation M460V nach. Diese wurde erstmals in Probe hu 3549 von Tag 293 nach TX mit einem Anteil von 10,5% nachgewiesen. Ihr Maximum erreichte sie in der Probe hu 3949 von Tag 482 mit 26%. In der Sanger-Sequenzierung gelang ihr Nachweis in den Proben hu 3948 von Tag 451 nach TX (50%), hu 4160 (60%) und hu 4161 (35%). Die Proben hu 3549, hu 3550 und hu 3949 konnten aufgrund wiederholt negativer PCR bei geringer Gesamtkopienzahl im Material der Sequenzierung nach Sanger nicht zugeführt werden.

### **5.5.3 Patient 10**

Im Probenmaterial von Patient 10 ließ sich die Mutation C603W in beiden Verfahren nachweisen. Die erste Detektion gelang sowohl in der PSQ als auch in der Sanger-Sequenzierung in Probe hu 3971 von Tag 41 nach Transplantation. Beide Methoden detektierten Mutantenanteile zwischen 80-100%. Für einen Sensitivitätsvergleich beider Methoden fehlen weitere Proben aus dem Zeitraum vor Tag 41. Die einzig vorliegende Probe hu 3970 war von

Tag 1 nach TX und erbrachte keinen Mutationsnachweis in der PSQ. Eine Sequenzanalyse nach Sanger war bei negativer PCR nicht möglich. Um in diesem Patientenfall eine Aussage über die frühzeitige Erkennung einer unter virostatistischer Therapie auftretenden resistenten HCMV-Subpopulation treffen zu können, reichte das untersuchte Patientenmaterial nicht aus. Proben aus dem Zeitraum zwischen Juli und September 2011 lagen nicht vor.

Theoretisch sollte auch der Anteil der Resistenz-tragenden Subpopulation an der Gesamt-HCMV-Population mit beiden Methoden ähnlich hoch bestimmt werden. Ursache für die Höhendiskrepanz der ermittelten Mutantenanteile in beiden Methoden könnten einerseits eventuelle Fehlamplifikationen hinsichtlich des korrekten Mengenverhältnisses zwischen Wildtyp- und Mutanten-Sequenz sein, da beiden Methoden unterschiedliche PCR-Ansätze vorgeschaltet waren. Andererseits kann auch eine insgesamt geringe Kopienzahl wie in Probe hu 3971 verantwortlich sein.

## **5.6 Ergebnisvergleich der PSQ-Ergebnisse mit denen der Klonierung**

Zur Evaluation der erhaltenen PSQ Ergebnisse der Proben, die den Nachweis mehrerer signifikanter Punktmutationen erbrachten, erfolgte im Anschluss die bakterielle Klonierung mit nachfolgender Sanger-Sequenzierung exemplarisch an vier ausgewählten Proben. Es galt zu differenzieren, ob es sich hierbei um das Nebeneinander mehrerer, jeweils nur in einem Codon mutierter Virusstämme, oder aber das Vorhandensein eines einzelnen, an mehreren Stellen mutierten Stammes handelte. Bis auf die Mutation A594V in Probe hu 3542, konnten alle in der PSQ erhaltenen Resistenz-assoziierten Punktmutationen auch über die Klonierung nachgewiesen werden. Ursächlich hierfür könnte jedoch die relativ geringe Anzahl der untersuchten Klone sein, die eine nur eingeschränkte Aussagekraft zulässt. Insgesamt ließ sich in den Sanger-Sequenzen der Klone entweder jeweils eine der per PSQ ermittelten Mutationen oder der Wildtyp nachweisen. Ein doppelt mutierter Virusstamm konnte über keinen der Klone detektiert werden. Dies gibt Hinweise darauf, dass es unter GCV Exposition zur Selektion mehrerer Virusstämme kommt, die die Resistenz durch unterschiedliche Punktmutationen bedingen. Das mögliche Vorkommen von Doppelmutanten lässt sich jedoch aufgrund der geringen Anzahl der untersuchten Klone nicht ausschließen.

## **5.7 Ergebnisvergleich von Sanger und PSQ mit denen des NGS**

Nach erfolgter Sequenzierung aller Patientenproben mittels Sanger und PSQ wurden einzelne Proben von Patient 3, in denen in einem der beiden oder beiden Verfahren Mutationen nachgewiesen wurden, zudem mit Hilfe der Amplicon-Sequenzierung analysiert. Während in der

PSQ die Mutation C603W erstmals an Tag 92 nach Transplantation detektiert wurde, zeigte sich diese in der Sanger erst am Tag 109. Die Amplicon-Sequenzierung erlaubte den Nachweis erstmals in Probe hu 3687 von Tag 111 nach TX, wobei die Proben zwischen Tag 47 und Tag 111 aufgrund des bereits aufgebrauchten Patientenmaterials nicht untersucht werden konnten. Ähnlich verhält es sich mit der Mutante L595F, die ebenfalls in der NGS erstmals an Tag 111 nach TX, nach erfolgtem Nachweis in Sanger und PSQ, detektiert wurde. Fanden sich in der PSQ in den untersuchten Proben Mutationen, so konnten diese auch mittels NGS bestätigt werden. Zusätzlich wies die Amplicon-Sequenzierung in Probe hu 3687 von Tag 111, hu 3965 von Tag 120 und hu 3967 von Tag 138 nach TX mit bis zu 21% die Resistenz-assoziierte Mutation A594V nach, welche in der PSQ in den genannten Proben ebenfalls mit Anteilen von 5,6 - 9,5% detektiert wurde, jedoch in der Sanger-Sequenzierung der Proben hu 3687 und hu 3967 unentdeckt blieb. Ein vereinzelter Nachweis gelang mittels Sanger in Probe hu 3965 mit etwa 20%. Dies lässt ggf. eine der PSQ ähnliche Nachweissensitivität der Amplicon-Sequenzierung vermuten. Um einen eventuellen Sensitivitätsvorteil der Amplicon-Sequenzierung hinsichtlich der frühzeitigen Detektion von Mutanten bei Überschuss von HCMV Wildtyp aufzuzeigen, fehlt jedoch die Analyse der entscheidenden Proben zwischen Tag 47 und Tag 111 nach TX, die aufgrund des bereits aufgebrauchten Patientenmaterials nicht durchgeführt werden konnte. Somit ist eine Aussage über die Sensitivität der NGS-Assays anhand der erhaltenen Daten nicht möglich. Auch wäre zur näheren Evaluation der Nachweisgrenze der Assays eine Analyse unter zu Hilfenahme von Plasmidmischungen mit definierten Mutantenanteilen zu empfehlen. Als vorteilhaft erweist sich die Methode durch den möglichen Nachweis bisher unbekannter oder seltenerer Mutationen, deren Einfluss auf die Wirksamkeit von GCV und anderen Virostatika nicht geklärt ist. Diese werden im SNP Modus der PSQ nicht nachgewiesen bzw. führen ggf. zum Abbruch der Sequenzierung. Somit weist die PSQ zwar verlässlich die häufigsten bekannten Resistenz-assoziierten Mutationen nach, weitere können jedoch übersehen werden. Im untersuchten Material ließen sich mit Hilfe der Amplicon-Sequenzierung mehrere solche Mutationen mit unterschiedlichen Anteilen von bis zu 100% im Patientenmaterial detektieren. Unter anderem ließ sich vereinzelt die Mutationen H469R und N510D nachweisen. Chou fand 2010 in denselben Codons die Mutationen H469Y und N510S. Diese zeigten in Marker Transfer Tests mit anschließender Ermittlung der IC50 keine herabgesetzte Sensibilität gegenüber GCV im Vergleich zum Wildtyp. In der Literatur wurden wiederholt Sequenzvarianten beschrieben, welche zum Teil bereits vor einer antiviralen Therapie detektiert worden sind und bei denen es sich daher vermutlich lediglich um nicht Resistenz-assoziierte Polymorphismen handelt. Letztlich fehlen hierzu jedoch oftmals ausreichende Daten,

um eine sichere Unterscheidung zwischen Polymorphismus, Resistenz-Mutante und Fehlmessung zu unternehmen (Chou 2010). Trotz Mehrfachabdeckung der Genomabschnitte in den verwendeten Amplicon-Assays konnte keine der bisher unbekannt Mutationen in einer Probe wiederholt detektiert werden. Auch ein erneuter Nachweis in einer der folgenden Proben gelang nicht, so dass hier in erster Linie von Hintergrundsignalen oder auch Verunreinigungen ausgegangen werden muss.

## **5.8 Mutationssuche im ORF UL54**

In den vergangenen Jahren wurden wiederholt neue Mutationen im ORF UL54 gefunden, wobei die Interpretation molekulargenetischer Resistenztestungen immer wieder durch die phänotypische Vielgestaltigkeit genotypisch ähnlicher UL54 Varianten erschwert wird (Chou 2011). Resistenz-assoziierte Mutationen im ORF UL54 treten in der Regel erst nach prolongierter Exposition gegenüber GCV auf und sind insgesamt wesentlich seltener als im ORF UL97. Meist besteht bereits eine relevante Mutation im ORF UL97, bevor hier Mutationen entstehen (Gilbert 2002, Chou 2015). Jedoch können diese neben einer herabgesetzten Empfindlichkeit gegenüber GCV auch Kreuzresistenzen gegenüber Cidofovir oder Foscarnet bedingen. In den letzten Jahren wurden zudem immer wieder Fälle beschrieben bei denen Mutationen in UL54 isoliert auftraten (Harada et al 1997, Mousavi-Jazi et al 2001, Boivin et al 2005), was die Relevanz einer Resistenztestung in beiden ORFs verdeutlicht. Dabei besteht die Herausforderung in der Analyse der UL54 DNA Polymerase zum einen in dem Auftreten multipler natürlicher Polymorphismen, welche ein Primerannealing in bestimmten Genomabschnitten unmöglich machen. Zum anderen sind die bisher bekannten mutations-tragenden Genomabschnitte auf dem ORF weit verteilt, was den Einsatz einer nested PCR zur Amplifikation erforderlich macht. Durch das Hintereinanderschalten mehrerer PCR-Durchläufe vor der eigentlichen Sequenzierung kommt es nicht nur zu einer zeitlichen Verzögerung bis zum Erhalt der Sequenz, auch das Risiko für Kontaminationen steigt (Hall Sedlak 2013). Wie bereits im Abschnitt 4.2. diskutiert, kann es mit jedem PCR-Durchlauf zudem durch stochastische Effekte, sowie durch unterschiedliche Effizienz beim Primerannealing zur variablen Amplifikation von Subpopulationen in mischinfiziertem Patientenmaterial kommen, was insbesondere bei geringer Genomkopienzahl im Ansatz ins Gewicht fällt (Sahoo 2013). Es erfolgte daher die Analyse ausgewählter Patientenproben, in denen zuvor hohe Viruslasten nachgewiesen wurden. Dennoch konnten von 42 Ansätzen nur 28 Proben erfolgreich amplifiziert werden, wobei vorrangig Proben mit einer zuvor mittels Real-time PCR ermittelten Kopienzahl von unter 10000/ml kein Amplifikat erbrachten. Eine mögliche Erklärung könnte in einer

unzureichenden Menge intakter UL54 DNA im Ansatz bestehen, welche durch zuvor durchgeführte Aufarbeitungsschritte (Extraktion) oder durch lange Lagerung einzelner Proben bedingt sein könnte.

## **5.9 Ausblick**

### **5.9.1 Diagnostische Verfahren zum Mutationsnachweis**

Um ein Therapieversagen aufgrund von Resistenzentwicklungen frühzeitig zu erkennen und mit einer entsprechenden Therapieumstellung reagieren zu können, ist eine schnelle und sensitive Detektion von Resistenz-assoziierten Mutationen im HCMV-Genom erforderlich. Da bereits geringe Anteile einer Resistenzmutante in Mischpopulationen die IC50-ratio für Ganciclovir erheblich steigern können, stößt man mit der Anwendung der konventionellen Sanger-Sequenzierung, welche nach wie vor als klinischer Goldstandard gilt, zunehmend an methodische Grenzen. In den letzten Jahren mehrten sich die Publikationen über alternative Technologien zur gezielten Sequenzierung Resistenz-tragender Genomabschnitte im ORF UL97 und ORF UL54. Dabei fanden sowohl Real-time PCR (Göhring et al. 2006, Yeo et al. 2005), Pyrosequenzierung (Schindele et al. 2010, Kampmann 2011, Benzi 2012), als auch Next Generation Sequencing (Sahoo 2013, Chou 2014) erfolgreich Anwendung. Jüngste Studien zeigten zudem eine Steigerung der Nachweissensitivität für die Detektion Resistenz-assoziiierter Mutationen durch die parallele Anwendung konventioneller und neuer Technologien auf (Sahoo 2013). Um neuere Verfahren in der klinischen Routinediagnostik zu etablieren, fehlt es derzeit jedoch an standardisierten Prozessen und adäquaten Qualitätskontrollen (Chou 2015). Hinzu kommt, dass neuere Sequenzierverfahren, wie die Amplicon-Sequenzierung, aktuell aufgrund der Menge der einzusetzenden Primer sowie der benötigten Hard- und Software im Vergleich zur konventionellen Sequenzierung noch relativ kostenintensiv sind. Mit einer zunehmenden Einsatzbreite dieser Verfahren ist jedoch auch mit einer Steigerung der Kosteneffektivität zu rechnen.

Im durchgeführten Methodenvergleich von Sanger-Sequenzierung, PSQ und Amplicon-Sequenzierung zeigt sich die PSQ insbesondere hinsichtlich eines sensitiven Nachweises minoritärer Mutantenanteile in mischinfiziertem Patientenmaterial deutlich überlegen. Da die Amplicon-Sequenzierung mit dem Roche 454 Sequencer auf dem Verfahren der PSQ basiert, ist auch hier eine ähnliche Sensitivität anzunehmen, konnte jedoch in der vorliegenden Arbeit aufgrund der geringen untersuchten Probenzahl nicht bestätigt werden. Dabei liegen die Unterschiede beider Methoden zum einen in ökonomischen Aspekten, zum anderen aber vor

allem in den resultierenden Daten. Während mit der PSQ im SNP Modus gezielt die Codons analysiert werden, in denen bereits Resistenz-bedingende Mutationen beschrieben wurden, weist die Amplicon-Sequenzierung jegliche Mutationen nach, die im amplifizierten Genomabschnitt enthalten sind. Somit ergibt sich hier die Möglichkeit auch bisher unbekannte Mutationen zu detektieren und auf ihren Einfluss auf die IC<sub>50</sub> von GCV zu untersuchen. Aufgrund der geringen Datenmenge aus den Amplicon-Sequenzierungen dieser Arbeit sind jedoch weiterführende Untersuchungen zur genaueren Evaluation ihres Potenzials im klinischen Einsatz erforderlich. Alles in allem könnte sich die Pyrosequenzierung derzeit als bevorzugtes Verfahren im klinischen Alltag etablieren, da sie bei überschaubarem Zeit- und Kostenaufwand einen gezielten Nachweis der wichtigsten Resistenz-assoziierten Mutationen ermöglicht. Insbesondere hinsichtlich ihrer Nachweisgrenze von 6% bei der Detektion minoritärer Mutantenanteile in Virusmischpopulation ist sie der Sanger-Sequenzierung überlegen.

### **5.9.2 Therapeutische Optionen**

Aufgrund der zunehmenden Resistenzentwicklung gegenüber den derzeit zur Prophylaxe und Behandlung einer CMV-Infektion zugelassenen Virostatika, die alle als Angriffspunkt die virale DNA-Polymerase haben, steigt die Nachfrage nach neueren Medikamenten mit alternativen Wirkmechanismen. So befindet sich Letermovir, welches den viralen Terminase-Komplex angreift, nach erfolgreichen Phase II Studien, die sowohl die antivirale Wirksamkeit im Vergleich zum Placebo bestätigten, als auch ein geringes Auftreten von Nebenwirkungen aufzeigen konnten (Chemaly 2014), aktuell in Phase III Studien zur prophylaktischen Anwendung nach Stammzelltransplantation. Dabei ist nicht nur ein Einsatz als Monotherapie mit entsprechenden Substanzen vielversprechend. Ebenso könnte die Möglichkeiten einer kombinierten Therapie mit mehreren antiviralen Wirkstoffen, deren Angriffsziele sich möglichst unterscheiden, wie sie bereits in der Behandlung von HIV und Hepatitis C Anwendung findet, das Risiko für das Auftreten von Resistenzen vermindern (Chou 2015).

## 6 Literaturverzeichnis

- Alain, S., Revest, M., Veyer, D., et al. Maribavir use in practice for cytomegalovirus infection in French transplantation centers. *Transplant Proc.* 2013, 45(4), 1603–7.
- Baldanti, F., Michel, D., Simoncini, et al. Mutations in the UL97 ORF of ganciclovir-resistant clinical cytomegalovirus isolates differentially affect GCV phosphorylation as determined in a recombinant vaccinia virus system. *Science* 2002, 54, 59 – 67.
- Benzi, F., Vanni, I., Cassina, G., et al. Detection of ganciclovir resistance mutations by pyrosequencing in HCMV-infected pediatric patients. *J Clin Virol.* 2012 May; 54(1), 48–55.
- Biron, K. K. Antiviral drugs for cytomegalovirus diseases. *Antiviral Res.* 2006, 71(2-3), 154–63.
- Biron, K. K., Fyfe, J. A., Stanat, S. C., et al. A human cytomegalovirus mutant resistant to the nucleoside analog 9- {[ 2-hydroxy-1- ( hydroxymethyl ) ethoxy ] methyl } guanine ( BW B 759U ) induces reduced levels of BW B759U triphosphate, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 Nov;83(22):8769-73.
- Boivin, G., Goyette, N., Gilbert, C., & Covington, E. Analysis of cytomegalovirus DNA polymerase (UL54) mutations in solid organ transplant patients receiving valganciclovir or ganciclovir prophylaxis. *J Med Virol.* 2005, 77(3), 425–9.
- Boivin, G., Goyette, N., Rollag, H., Jardine, A. G., Pescovitz, M. D., & Asberg, A. Cytomegalovirus resistance in solid organ transplant recipients treated with intravenous ganciclovir or oral valganciclovir, *Antivir Ther.* 2009;14(5):697-704.
- Castor, J., Cook, L., Corey, L., & Jerome, K. R. Rapid detection directly from patient serum samples of human cytomegalovirus UL97 mutations conferring ganciclovir resistance. *J Clin Microbiol.* 2007, 45(8), 2681–3.
- Chemaly, R. F., Ullmann, A. J., Stoelben, S., et al. Letermovir for cytomegalovirus prophylaxis in hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med.* 2014, 370(19), 1781–9.
- Chevillotte, M., Einem, J. Von, Meier, B. M., et al. A new tool linking human cytomegalovirus drug resistance mutations to resistance phenotypes. *Antiviral Res.* 2010, 85, 318–327.
- Chou, S, Lurain, N. S., Weinberg, a, Cai, G. Y., Sharma, P. L., & Crumpacker, C. S. Interstrain variation in the human cytomegalovirus DNA polymerase sequence and its effect on genotypic diagnosis of antiviral drug resistance. *Adult AIDS Clinical Trials Group CMV Laboratories. Antimicrob Agents Chemother.* 1999, 43(6), 1500–2.
- Chou, Sunwen. Cytomegalovirus UL97 mutations in the era of ganciclovir and maribavir. *Rev Med Virol.* 2008, (March), 233–246.
- Chou, Souwen. Recombinant phenotyping of Cytomegalovirus UL97 kinase sequence variants for ganciclovir resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Jun; 54(6), 2371-8.
- Chou, Sunwen. Phenotypic diversity of cytomegalovirus DNA polymerase gene variants observed after antiviral therapy. *J Clin Virol.* 2011, 50(4), 287–91.

- Chou, Sunwen. Approach to drug-resistant cytomegalovirus in transplant recipients. *Curr Opin Infect Dis.* 2015, 28(4), 293–9.
- Chou, Sunwen, Erice, A., Jordan, M. C., et al. Analysis of the UL97 Phosphotransferase Coding Sequence in Clinical Cytomegalovirus Isolates and Identification of Mutations Conferring Ganciclovir Resistance. *J Infect Dis.* 1995 Mar;171(3):576-83
- Chou, Sunwen, Waldemer, R. H., Senters, A. E., et al. Cytomegalovirus UL97 phosphotransferase mutations that affect susceptibility to ganciclovir. *J Infect Dis.* 2002, 185(2), 162–9.
- Cihlar, T., Fuller, M. D., & Cherrington, J. M. 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 Jul;72(7):5927-36.
- Cihlar, T., Fuller, M. D., Mulato, A. S., & Cherrington, J. M. A Point Mutation in the Human Cytomegalovirus DNA Polymerase Gene Selected in Vitro by Cidofovir Confers a Slow Replication Phenotype in Cell Culture. *Virology.* 1998 Sep 1;248(2):382-93.
- Crapnell, K., Zanjani, E. D., Chaudhuri, A., Ascensao, J. L., Jeor, S. S., & Maciejewski, J. P. In vitro infection of megakaryocytes and their precursors by human cytomegalovirus. *Blood.* 2000 Jan 15;95(2):487-93
- ECIL Guidelines update 2011, [http://www.eortc.org/wp-content/uploads/2015/07/ECIL-4\\_2011-Update-2011-CMV.pdf](http://www.eortc.org/wp-content/uploads/2015/07/ECIL-4_2011-Update-2011-CMV.pdf)
- Eckle, T., Jahn, G., & Hamprecht, K. The influence of mixed HCMV UL97 wildtype and mutant strains on ganciclovir susceptibility in a cell associated plaque reduction assay. *J. Clin. Virol.* 2004, 30, 50–56.
- Erice A, Chou S, Biron KK, Stanat SC, Balfour HH Jr, Jordan MC. Progressive disease due to ganciclovir-resistant cytomegalovirus in immunocompromised patients. *N Engl J Med.* 1989 Feb 2;320(5):289-93.
- Erice, A., Gil-roda, C., Balfour, H. H., et al. Antiviral Susceptibilities and Analysis of UL97 and DNA Polymerase Sequences of Clinical Cytomegalovirus Isolates from Immunocompromised Patients. *J Infect Dis.* 1997 May;175(5):1087-92.
- Gandhi, M. K., & Khanna, R. Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. *Lancet Infect Dis.* 2004, 4(12), 725–38.
- 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 Dec;49(12):4860-6.
- Gilbert, Christian, Bestman-Smith, J., & Boivin, G. Resistance of herpesviruses to antiviral drugs: clinical impacts and molecular mechanisms. *Drug Resist Updat.* 2002, 5(2), 88–114.

- Göhring, Mikeler, E., Jahn, G., & Hamprecht, K. Rapid Simultaneous Detection by Real-Time PCR of Cytomegalovirus UL97 Mutations in Codons 460 and 520 Conferring. *Society* 2006, 44(12), 4541–4544.
- Hall Sedlak, R., Castor, J., Butler-Wu, S. M., et al. Rapid detection of human cytomegalovirus UL97 and UL54 mutations directly from patient samples. *J. Clin. Microb.* 2013, 51(7), 2354–9.
- Hanks, S. K., Quinn, A. M., and Hunter, T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 1988, 241, 42-52
- Hanson, M. N., Preheim, L. C., Chou, S., Talarico, C. L., Biron, K. K., & Erice, A. Novel mutation in the UL97 gene of a clinical cytomegalovirus strain conferring resistance to ganciclovir. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995, 39(5), 1204–5.
- Harada, K., Eizuru, Y., Isashiki, Y., Ihara, S., & Minamishima, Y. Genetic analysis of a clinical isolate of human cytomegalovirus exhibiting resistance against both ganciclovir and cidofovir. *Arch Virol.* 1997;142(2):215-25.
- Hermann, E.C. Jr. The detection, assay and evaluation of antiviral drugs. *Progr Med Virol.* 3, 1961, 158-192.
- Humar, A, & Snyderman, D. Cytomegalovirus in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant.* 2009 Dec, 9 Suppl 4, S78–86.
- 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. *Science* 2002, 53, 135– 142.
- Jabara, C. B., Jones, C. D., Roach, J., Anderson, J. A., & Swanstrom, R. Accurate sampling and deep sequencing of the HIV-1 protease gene using a Primer ID. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011, 108(50), 20166–71.
- Jabs, D. A., Enger, C., Dunn, J. P., Forman, M. Cytomegalovirus Retinitis and Viral Resistance : Ganciclovir Resistance. *J Infect Dis.* 1998 Mar;177(3):770-3.
- Kampmann, S. E., Schindele, B., Apelt, L., et al. Pyrosequencing allows the detection of emergent ganciclovir resistance mutations after HCMV infection. *Med Microbiol Immunol.* 2011, 200(2), 109–13.
- Kotton, C. N., Kumar, D., Caliendo, et al. Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. *Transplantation* 2013, 96(4), 333–60.
- Krosky, P. M., Baek, M., & Coen, D. M. The Human Cytomegalovirus UL97 Protein Kinase , an Antiviral Drug Target, Is Required at the Stage of Nuclear Egress. *J Virol.* 2003 Jan;77(2):905-14.

- Lataillade, M., Chiarella, J., Yang, R., et al. Prevalence and clinical significance of HIV drug resistance mutations by ultra-deep sequencing in antiretroviral-naïve subjects in the CASTLE study. *PLoS One*. 2010 Jun 3;5(6):e10952.
- Le, T., Chiarella, J., Simen, B. B., Hanczaruk, B., et al. Low-abundance HIV drug-resistant viral variants in treatment-experienced persons correlate with historical antiretroviral use. *PloS One* 2009, 4(6), e6079.
- Limaye, a P., Corey, L., Koelle, D. M., Davis, C. L., & Boeckh, M. Emergence of ganciclovir-resistant cytomegalovirus disease among recipients of solid-organ transplants. *Lancet* 2000, 356(9230), 645–9.
- Littler, E., Stuart, A.D., and Chee, M.S. Human cytomegalovirus UL97 open reading frame encodes a protein that phosphorylates the antiviral nucleoside analogue ganciclovir. *Nature* 1992, 358, 160-62.
- Lurain, N. S., Thompson, K. D., Holmes, E. W., & Read, G. S. Point mutations in the DNA polymerase gene of human cytomegalovirus that result in resistance to antiviral agents. *J. Virol.* 1992, 66(12), 7146–52.
- Lurain, N. S., & Chou, S. Antiviral Drug Resistance of Human Cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev.* 2010, 23(4), 689–712.
- Lurain, N. S., Spafford L. E., Thompson K. D. Mutation in the UL97 open reading frame of human cytomegalovirus strains resistant to ganciclovir. *J Virol.* 1994 Jul;68(7):4427-31.
- Lurain, N. S., Bhorade, S. M., Pursell, K. J., et al. Analysis and Characterization of Antiviral Drug – Resistant Cytomegalovirus Isolates from Solid Organ Transplant Recipients. *J Infect Dis.* 2002 Sep 15;186(6):760-8.
- Marty, F. M., Ljungman, P., Papanicolaou, D. J., et al. Maribavir prophylaxis for prevention of cytomegalovirus disease in recipients of allogeneic stem-cell transplants: a phase 3, double-blind, placebo-controlled, randomised trial. *Lancet. Infect Dis.* 2011, 11(4), 284–92.
- McGeoch, D. J., Cook, S., Dolan, A., Jamieson, F. E., & Telford, E. A. Molecular phylogeny and evolutionary timescale for the family of mammalian herpesviruses. *J Mol Biol.* 1995, 247(3), 443–58.
- Meara, D. O., Wilbe, K., Leitner, T., Hejdeman, B. O., & Albert, J. A. N. Monitoring Resistance to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease Inhibitors by Pyrosequencing. *J Clin Microbiol.* 2001 Feb;39(2):464-73
- Mendelson, M., Monard, S., Sissons, P., & Sinclair, J. Detection of endogenous human cytomegalovirus in CD34+ bone marrow progenitors. *J. Gen. Virol.* 1996, 77 (Pt 12), 3099–102.
- Michel, D., Pavić, I., Zimmermann, A, et al. 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.

- Michel, D., Schaarschmidt, P., Wunderlich, K., et al. 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.
- Mocarsci Jr, E., and Shenk, T. (2007). *Cytomegaloviruses. Fields Virology* (Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins)
- Mousavi-Jazi, M., Schloss, L., Drew, W. L., et al. Variations in the cytomegalovirus DNA polymerase and phosphotransferase genes in relation to foscarnet and ganciclovir sensitivity. *J Clin Virol.* 2001 Dec;23(1-2):1-15.
- Nichols, W. G., 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.
- Ortiz, A., Justo, P., Sanz, A., et al. Tubular cell apoptosis and cidofovir-induced acute. *Antivir Ther.* 2005;10(1):185-90.
- Prichard, M. N., Sztul, E., Daily, S. L., et al. Human cytomegalovirus UL97 kinase activity is required for the hyperphosphorylation of retinoblastoma protein and inhibits the formation of nuclear aggresomes. *J Virol.* 2008, 82(10), 5054–67.
- Ross, S. A., & Boppana, S. B. Congenital cytomegalovirus infection: outcome and diagnosis. *Semin Pediatr Infect Dis.* 2005, 16(1), 44–9.
- Rothberg, J. M., & Leamon, J. H. The development and impact of 454 sequencing. *Nat Biotechnol.* 2008, 26(10), 1117–24.
- Sahoo, M. K., Lefterova, M. I., Yamamoto, F., et al. Detection of cytomegalovirus drug resistance mutations by next-generation sequencing. *J Clin Microb.* 2013, 51(11), 3700–10.
- Schindele, B., Apelt, L., Hofmann, J., et al. Improved detection of mutated human cytomegalovirus UL97 by pyrosequencing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010, 54(12), 5234–41.
- Shaiegan, M., Rasouli, M., Zadsar, M., & Zolfaghari, S. Meta - analysis of cytomegalovirus seroprevalence in volunteer blood donors and healthy subjects in Iran from 1992 to 2013. *Iran J Basic Med Sci.* 2015 Jul;18(7):627-34.
- Shigemi, D., Yamaguchi, S., Otsuka, T., Kamoi, S., & Takeshita, T. Seroprevalence of cytomegalovirus IgG antibodies among pregnant women in Japan from 2009-2014. *Am J Infect Control.* 2015, 43(11), 1218–21.
- Shokralla, S., Spall, J. L., Gibson, J. F., & Hajibabaei, M. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Mol Ecol.* 2012, 21(8), 1794–805.
- Sijmons, S., Van Ranst, M., & Maes, P. Genomic and functional characteristics of human cytomegalovirus revealed by next-generation sequencing. *Viruses* 2014, 6(3), 1049–72.

- Simen, B. B., Simons, J. F., Hullsiek, K. H., et al. Low-abundance drug-resistant viral variants in chronically HIV-infected, antiretroviral treatment-naive patients significantly impact treatment outcomes. *J Infect Dis.* 2009, 199(5), 693–701.
- Smith, I. L., Cherrington, J. M., Jiles, R. E., Fuller, M. D., Freeman, W. R., & Spector, S. A. 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.
- St John, E.P., Simen, B.B., Turenschalk, B.S., et al. A Follow-Up of the Multicenter Collaborative Study on HIV-1 Drug Resistance and Tropism Testing Using 454 Ultra Deep Pyrosequencing. *PLoS One* 2016 Jan 12, 11(1):e0146687.
- Sullivan, V., Talarico C. L., Stanat S. C., Davis M., Coen D. M., Biron K. K. A protein kinase homologue controls phosphorylation of ganciclovir in human CMV-infected cells. *Nature.* 1992 Sep 3;359(6390):85
- Sullivan, V., Biron, K. K., Talarico, C., et al. A point mutation in the human cytomegalovirus DNA polymerase gene confers resistance to ganciclovir and phosphonylmethoxyalkyl derivatives. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993, 37(1), 19–25.
- Talarico, C. L., Burnette, T. C., Miller, W. H., et al. (1999). Acyclovir Is Phosphorylated by the Human Cytomegalovirus UL97 Protein. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999 Aug;43(8):1941-6
- Taylor-Wiedeman, J., Sissons, J. G., Borysiewicz, L. K., & Sinclair, J. H. Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *J Gen Virol.* 1991, 72 (Pt 9), 2059–64.
- Thomas, M., Rechter, S., Milbradt, J., et al. Cytomegaloviral protein kinase pUL97 interacts with the nuclear mRNA export factor pUL69 to modulate its intranuclear localization and activity. *J Gen Virol.* 2009, 90(Pt 3), 567–78.
- Torres-Madriz, G., & Boucher, H. W. Immunocompromised hosts: perspectives in the treatment and prophylaxis of cytomegalovirus disease in solid-organ transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 2008, 47(5), 702–11.
- Tsibris, A. M. N., Korber, B., Arnaout, R., et al. Quantitative deep sequencing reveals dynamic HIV-1 escape and large population shifts during CCR5 antagonist therapy in vivo. *PLoS One* 2009, 4(5), e5683.
- Verghese P.S., Schleiss, M. R. Letermovir Treatment of Human Cytomegalovirus Infection Antiinfective Agent. *Drugs Future.* 2013 May;38(5):291-298.
- Vilibic-Cavlek, T., Kolaric, B., Ljubin-Sternak, S., Kos, M., Kaic, B., & Mlinaric-Galinovic, G. Prevalence and dynamics of cytomegalovirus infection among patients undergoing chronic hemodialysis. *Indian J Nephrol.* 2015, 25(2), 95–8.
- Wolf, D. G., Courcelle, C. T., Prichard, M. N., & Mocarski, E. S. 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.

Yeo, A. C., Peng, K., Kumarasinghe, G., & Kim, H. Rapid detection of codon 460 mutations in the UL97 gene of ganciclovir-resistant cytomegalovirus clinical isolates by real-time PCR using molecular beacons. *Mol Cell Probes*. 2005, 19, 389–393.

Zytomegalievirus-Infektion, Ratgeber für Ärzte, Stand: 20.01.2014  
[http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_Zytomegalievirus.html](http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Zytomegalievirus.html)

## 7 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AD169	HCMV Laborstamm
AIDS	<i>Acquired Immuno Deficiency Syndrome</i> ; erworbenes Immundefektsyndrom
as	<i>antisense</i> ; Rückwärts-Primer
(d)ATP	(Desoxy)Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
bio	biotinyliert
C	Cytosin
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CCD	<i>charge-coupled device</i> ; ladungsgekoppeltes Bauteil
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> ; Unterscheidungsgruppen
CDV	Cidofovir
(d)CTP	(Desoxy)Cytosintriphosphat
Ct-Wert	<i>cycle threshold</i> ; Schwellenwert-Zyklus
D+/-	Donor positiv/negativ
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
(ds)DNA	(Doppelstrang)-Desoxyribonukleinsäure
EBV	Eppstein-Barr-Virus
ECIL	<i>European Conference on Infections in Leukaemia</i>
E.coli	Escherichia coli
<i>Eco</i> R1	Restriktionsenzym

FOS	Foscavir
G	Guanin
GCV	Ganciclovir
(d)GTP	(Desoxy)Guanintriphosphat
HCMV	humanes Cytomegalievirus
HHV5	humanes Herpesvirus 5
HIV	humanes Immunodefizienzvirus
HLA	humanes Leukozytenantigen
IC50	<i>half maximal inhibitory concentration</i> ; mittlere inhibitorische Konzentration
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
kbp	Kilobasenpaare
kDa	KiloDalton
MCS	<i>multiple cloning site</i> ; Sequenzabschnitt in einem Vektor, der mehrere Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen enthält
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minuten
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
mut	Mutation
NaOH	Natriumhydroxyd
NGS	<i>Next generation sequencing</i> ; Hochdurchsatz-Sequenzierung
nm	Nanometer
NTP	Ribonukleosidtriphosphat
ORF	<i>open reading frame</i> ; offener Leserahmen

PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerasekettenreaktion
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pol	Polymerase
PSQ	Pyrosequenzierung
pUL97	Protein, das vom HCMV-Gen UL97 kodiert wird
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i>
s	<i>sense</i> ; Vorwärts-Primer
sek	Sekunden
SNP	<i>single nucleotid polymorphism</i> ; Variationen einzelner Basenpaare in einem DNA-Strang
SOC	Salz-optimiertes Medium mit Glucose
SQA	Sequenz Analyse
T	Thymin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Tm	Temperatur
(d)TTP	(Desoxy)Thymintriphosphat
UL97	HCMV-Gen, das für die pUL97-Kinase kodiert
UV	ultraviolett
Val-GCV	Valganciclovir
wt	Wildtyp
ZNS	Zentralnervensystem
μM	Mikromol

## 8 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Jenny Mitteldorf, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Evaluierung moderner Sequenziermethoden in der frühzeitigen Diagnostik therapieresistenter Mutanten des humanen Zytomegalievirus“ 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 beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Unterschrift

## **9 Lebenslauf**

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