

**Phänotypische und genotypische Resistenz von
Varicella-Zoster-Virus-Stämmen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Johanna Taut,

geboren am 21. Juni 1988 in Leipzig

Gutachter

- | | |
|--|-------------------------------------|
| 1. Prof. Dr. med. habil. Andreas Sauerbrei | Friedrich-Schiller-Universität Jena |
| 2. Prof. Dr. med. Wolfgang Pfister | Friedrich-Schiller-Universität Jena |
| 3. Prof. Dr. med. Heinz Zeichhardt | Freie Universität Berlin |

Tag der öffentlichen Verteidigung: Jena, den 25.11.2014

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ACV	Aciclovir
AE	Elutionspuffer
Ala	Alanin
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
Asn	Asparagin
ATP	Adenosintriphosphat
AW1	Waschpuffer 1
AW2	Waschpuffer 2
BCNA	Bizyklische Nukleosidanaloga
bp	Basenpaare
BVDU	(E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridin
bzw.	Beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	Circa
CDV	Cidofovir
CMV	Zytomegalievirus
cpE	Zytopathischer Effekt
Cys	Cystein
Da	Dalton
ddNTP	Didesoxyribonukleotidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	Destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-Pol	Desoxyribonukleinsäure-Polymerase
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
E	Early
EB	Elutionspuffer
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay
EMA	European Medicines Agency
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
et al.	Und Mitarbeiter
FAMA	Fluoreszenz-Antikörper-Membran-Antigen-Test

FDA	Food and Drug Administration
5-FU	5-Fluorouracil
x g	x Erdbeschleunigung
G	Guanin
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
h	Stunde
HELF	Humane Embryonale Lungenfibroblasten
His	Histidin
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HSV	Herpes-simplex-Virus
HZ	Herpes Zoster
IC ₅₀	Inhibitorische Konzentration 50%
IE	Immediate early
Ig	Immunglobulin
Ile	Isoleucin
i.m.	Intramuskulär
IR _L	Internale Repeatregion der langen Untereinheit
IR _S	Internale Repeatregion der kurzen Untereinheit
i.v.	Intravenös
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KV	Kristallviolett
l	Liter
L	Late
Leu	Leucin
Lfd. Nr.	Laufende Nummer
Lys	Lysin
M	Mol
Met	Methionin
mg	Milligramm
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
MOI	Multiplicity of Infection
µg	Microgramm
µl	Microliter

n.k.	Nicht klassifiziert
Nr.	Nummer
Nt	Nukleotid
ORF	Open Reading Frame
PBI	Bindungspuffer
PCR	Polymerasekettenreaktion
PCV	Penciclovir
PE	Reinigungspuffer
p.i.	Post infectionem
pOka	Parental Oka
PZN	Postzosterische Neuralgie
rER	Raues endoplasmatisches Retikulum
s	Sekunde
s.	Siehe
S.	Seite
Ser	Serin
SLS	Sample Loading Solution
SNP	Single Nukleotide Polymorphism
SSW	Schwangerschaftswoche
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCID ₅₀	Tissue Culture Infective Dose 50%
TE	Tris-HCl-EDTA
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
Thr	Threonin
TK	Thymidinkinase
TPF	Tri-Sodium-Phosphonoformat
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TR _L	Terminale Repeatregion der langen Untereinheit
TR _S	Terminale Repeatregion der kurzen Untereinheit
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
U	Unit
U _L	Lange Untereinheit
U _S	Kurze Untereinheit
UK	United Kingdom
UV	Ultraviolett
Val	Valin
vOka	Vaccine Oka

VZV

z.B.

ZK

ZNS

Varicella-Zoster-Virus

Zum Beispiel

Zellkontrolle

Zentralnervensystem

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	1
2. Einleitung.....	3
2.1 Molekularbiologie des Varicella-Zoster-Virus.....	3
2.1.1 Aufbau und Struktur.....	3
2.1.2 Replikationszyklus des Varicella-Zoster-Virus.....	5
2.1.3 Thymidinkinase.....	7
2.1.4 DNA-Polymerase.....	8
2.2 Pathogenese, Epidemiologie und Krankheitsbilder der Varicella-Zoster-Virus-Infektion..	8
2.2.1 Varizellen.....	10
2.2.2 Herpes Zoster.....	11
2.2.3 Varicella-Zoster-Virus-Infektion während einer Schwangerschaft.....	13
2.3 Diagnostik, Prophylaxe und Therapie der Varicella-Zoster-Virus-Infektion.....	14
2.3.1 Diagnostik.....	14
2.3.2 Prophylaxe.....	15
2.3.3 Therapie.....	17
2.3.4 Resistenzen des Varicella-Zoster-Virus gegenüber Virostatika.....	20
3. Zielstellung.....	23
4. Material und Methoden.....	24
4.1 Patienten.....	24
4.2 DNA-Patientenproben.....	26
4.3 Varicella-Zoster-Virus-Isolate.....	27
4.4 Varicella-Zoster-Virus-Referenzstämme.....	29
4.5 Virostatika.....	29
4.6 Zellkulturen.....	30
4.7 Phänotypische Resistenzbestimmung.....	30
4.7.1 Viruspassagierung.....	30
4.7.2 Bestimmung der Viruskonzentration des Referenzstammes.....	31
4.7.3 Plaquereduktionstest.....	31
4.7.4 Färbung mit Kristallviolett.....	33
4.7.5 Auswertung des Plaquereduktionstests.....	33
4.8 Genotypische Resistenzbestimmung.....	34
4.8.1 DNA-Isolierung.....	34
4.8.2 DNA-Amplifikation.....	35

4.8.3 Agarosegelelektrophorese.....	38
4.8.4 Aufreinigung der amplifizierten DNA-Fragmente.....	40
4.8.5 DNA-Sequenzierung.....	40
4.8.6 Analyse der Sequenzdaten.....	45
4.8.7 Statistische Analyse.....	45
4.9 Verwendete Kitsysteme.....	45
4.10 Geräte und technische Hilfsmittel.....	46
4.11 Rezepturen.....	47
5. Ergebnisse.....	48
5.1 Phänotypische Resistenzbestimmung.....	48
5.1.1 <i>Varicella-Zoster-Virus-Referenzstamm vOka</i>	48
5.1.2 <i>Patientenisolate</i>	48
5.2 Genotypische Resistenzbestimmung.....	50
5.2.1 <i>Varicella-Zoster-Virus-Referenzstämme</i>	50
5.2.2 <i>Aciclovir-sensitive Patientienstämme</i>	52
5.2.3 <i>Patientenstämme mit klinischer Aciclovir-Resistenz</i>	57
6. Diskussion.....	61
6.1 Aciclovir-sensitive <i>Varicella-Zoster-Virusstämme</i>	62
6.2 Klinisch resistente <i>Varicella-Zoster-Virusstämme</i>	64
6.3 Methoden der phänotypischen Resistenzbestimmung.....	68
6.4 Methoden der genotypischen Resistenzbestimmung.....	69
7. Schlussfolgerungen.....	72
8. Literaturverzeichnis.....	74
9. Anhang.....	80
9.1 Lebenslauf.....	80
9.2 Danksagung.....	81
9.3 Ehrenwörtliche Erklärung.....	82

1. Zusammenfassung

Das Varicella-Zoster-Virus (VZV) gehört zur Familie der Herpesviridae. Es ist ein weltweit vorkommendes, hochkontagiöses Virus, dessen einziger Wirt der Mensch ist. Die Primärinfektion führt zur Ausbildung von Varizellen, welche typischerweise im Kindesalter auftreten. Danach verbleibt das VZV latent in Nervenganglien. Von dort kann es bei einer Reaktivierung über periphere Nerven die Haut erreichen und einen Herpes Zoster auslösen. Die derzeit zur Behandlung von VZV-Infektionen zur Verfügung stehenden antiviralen Substanzen sind Aciclovir (ACV), Valaciclovir, Penciclovir, Famciclovir, Brivudin und Foscarnet. Bei immunsupprimierten Personen, welche einer langanhaltenden antiviralen Therapie unterliegen, kann es zur Ausbildung von Resistenzen gegenüber diesen Virostatika kommen. Ursache ist die Entstehung von Mutationen im viralen Thymidinkinase (TK)- oder DNA-Polymerase (DNA-Pol)-Gen. Um eine Resistenz zweifelsfrei zu belegen und eine effektive Therapie der betroffenen Patienten zu gewährleisten, muss eine Resistenztestung mittels virologischer Methoden durchgeführt werden. Bislang gibt es dazu jedoch nur wenige Erfahrungen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 59 klinische VZV-Stämme auf das Vorliegen einer ACV-Resistenz untersucht. Davon stammten 49 von Patienten ohne bekannte antivirale Therapie, und bei zehn Patienten lag eine klinische ACV-Resistenz vor. Die phänotypische Resistenztestung erfolgte mittels des Plaquereduktionstests, welcher die Empfindlichkeit der Virusstämme gegenüber den antiviralen Medikamenten ermittelt. Die genotypischen Untersuchungen basierten auf der Suche nach Genpolymorphismen bzw. Resistenzmutationen im viralen TK- und DNA-Pol-Gen. Dazu wurden diese Genomausschnitte amplifiziert und sequenziert. Die Auswertung erfolgte im Vergleich mit dem Referenzstamm *Dumas*. Vorkommende Aminosäure (AS)-Substitutionen der ACV-sensitiven VZV-Stämme konnten dem natürlichen Genpolymorphismus zugeordnet werden. Ausgewählte Substitutionen der klinisch resistenten VZV-Stämme waren als Hinweise für eine ACV-Resistenz anzusehen. Ziel dieser Arbeit war es, die bisher limitierten Erfahrungen und Kenntnisse zur Resistenztestung des VZV zu erweitern.

Im Ergebnis der phänotypischen Resistenztestung erwiesen sich alle VZV-Isolate von Patienten ohne bekannte antivirale Therapie als ACV-sensitiv. Nur bei zwei VZV-Stämmen der Patienten mit einer klinischen ACV-Resistenz gelang eine Virusanzüchtung und damit eine Prüfung des Resistenzphänotyps. Dabei wurde ein Stamm als ACV-resistent eingestuft. Nach Prüfung des Resistenzgenotyps besaßen alle klinischen VZV-Stämme als natürlichen

Genpolymorphismus die AS-Substitution Ser288Leu im TK-Gen. Des Weiteren konnten bei den klinisch ACV-resistenten VZV-Stämmen in diesem Gen die AS-Substitutionen Leu73Ile, Trp225Arg und Asn334Stopp gefunden werden, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit Resistenz-assoziiert sind. Davon wurden die Substitutionen Trp225Arg und Asn334Stopp erstmals nachgewiesen. Die Bedeutung der im TK-Gen gefundenen Substitutionen Thr256Met und Gln303Stopp konnte bereits als Ursache einer ACV-Resistenz in der Literatur belegt werden. Im DNA-Pol-Gen des VZV wurden die AS-Substitutionen Met286Ile, Glu824Gln, Ser863Gly, Arg984His und His1089Tyr als Bestandteil des natürlichen Genpolymorphismus nachgewiesen. Der AS-Austausch Ser863Gly stellte sich dabei als signifikantes Merkmal des Genotyps 5 heraus. Erstmals gelang der Nachweis der Genpolymorphismen Met286Ile, Glu824Gln, Arg984His und His1089Tyr. Außerdem wurde im DNA-Pol-Gen die neue Substitution Thr237Lys analysiert, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit für eine ACV-Resistenz verantwortlich ist.

Der natürliche Genpolymorphismus des VZV hat keinen Einfluss auf die Funktion der kodierten Enzyme. Jedoch spielt seine Kenntnis eine wichtige Rolle für die Interpretation Resistenz-assoziiierter Mutationen. Da die phänotypischen Untersuchungen nur in eingeschränktem Maße möglich sind, kann geschlussfolgert werden, dass die genotypische Analyse die Methode der Wahl zur Resistenzbestimmung des VZV darstellt.

2. Einleitung

2.1 Molekularbiologie des Varicella-Zoster-Virus

Die Familie des Herpesviridae gliedert sich in drei Subfamilien, welche als Alpha-, Beta- und Gammaherpesvirinae bezeichnet werden. Das Varicella-Zoster-Virus (VZV) gehört gemeinsam mit dem Herpes-simplex-Virus (HSV) Typ 1 und 2 zur Gruppe der Alphaherpesvirinae, und ihm übergeordnet steht der Genus Varicellovirus. Die Betaherpesvirinea schließen das Humane Zytomegalievirus (CMV) und die Humanen Herpesviren 6 und 7 ein. Der dritten Subfamilie Gammaherpesvirinae sind das Epstein-Barr-Virus und das Humane Herpesvirus 8 zugehörig (Davison et al. 2009).

2.1.1 Aufbau und Struktur

Das VZV besitzt im Inneren ein Core mit doppelsträngiger linearer DNA, welches von einem ikosaedrischen Kapsid, bestehend aus 162 Kapsomeren, umgeben ist. Umschlossen wird dieses von einem polypeptidhaltigen Tegument. Die äußere Begrenzung wird durch eine Hülle gebildet, die mit Glykoprotein-Spikes besetzt ist. Dieser strukturelle Aufbau ist in der Abbildung (Abb.) 1 schematisch dargestellt. Der Durchmesser eines Virions beträgt etwa 200 nm (Sauerbrei und Wutzler 2004b, Rahaus et al. 1999).

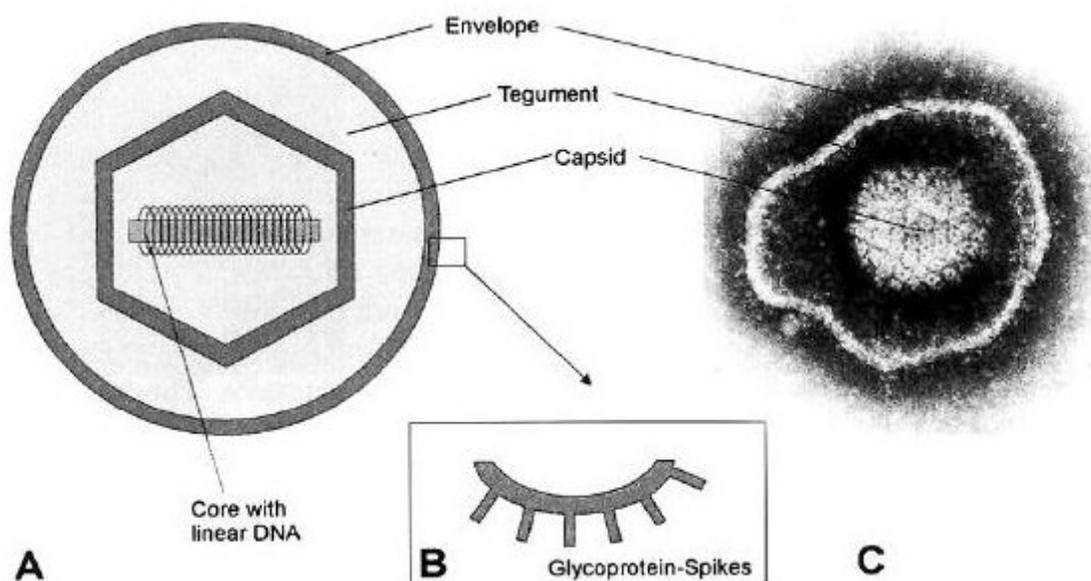


Abb. 1 Aufbau des VZV (Rahaus et al. 1999)

A: Schematische Darstellung des Virusaufbaus

B: Aufschnitt-Darstellung der Spikes

C: Elektronenmikroskopische Aufnahme des VZV

Besonders charakteristisch für das VZV ist das ungewöhnlich kleine Genom mit einer DNA-Gesamtlänge von 125 Kilobasen. Alle anderen Herpesviren besitzen im Gegensatz dazu ein längeres DNA-Molekül. Das Molekulargewicht beträgt 100×10^6 Dalton (Da) und der Guanin-Cytosin-Gehalt liegt bei 47% (Kinchington et al. 1985). Das Genom besteht aus zwei Untereinheiten (U_L und U_S), welche kovalent gebunden sind. U_L hat eine Länge von ungefähr 100.000 Basenpaaren (bp), und die von U_S beträgt ca. 5232 bp. Beide werden von invertierten repetitiven Regionen flankiert, welche internal bzw. terminal lokalisiert sein können. Zwei kurze Repeat-Regionen (IR_L , TR_L) mit einer Länge von ca. 88 bp rahmen U_L ein, und U_S wird von zwei ca. 7000 bp großen Repeat-Regionen (IR_S , TR_S) umschlossen (Davison 1984). Aufgrund verschiedener Orientierungsmöglichkeiten der Untereinheiten ergeben sich vier mögliche Isomere. Die Wahrscheinlichkeiten, dass beide Untereinheiten nach rechts orientiert sind oder nur U_S nach links ausgerichtet ist, liegen bei jeweils 48%. Daher ist das Vorkommen der beiden anderen Möglichkeiten mit je zwei Prozent sehr selten. Die verschiedenen Varianten sind der Abb. 2 zu entnehmen.

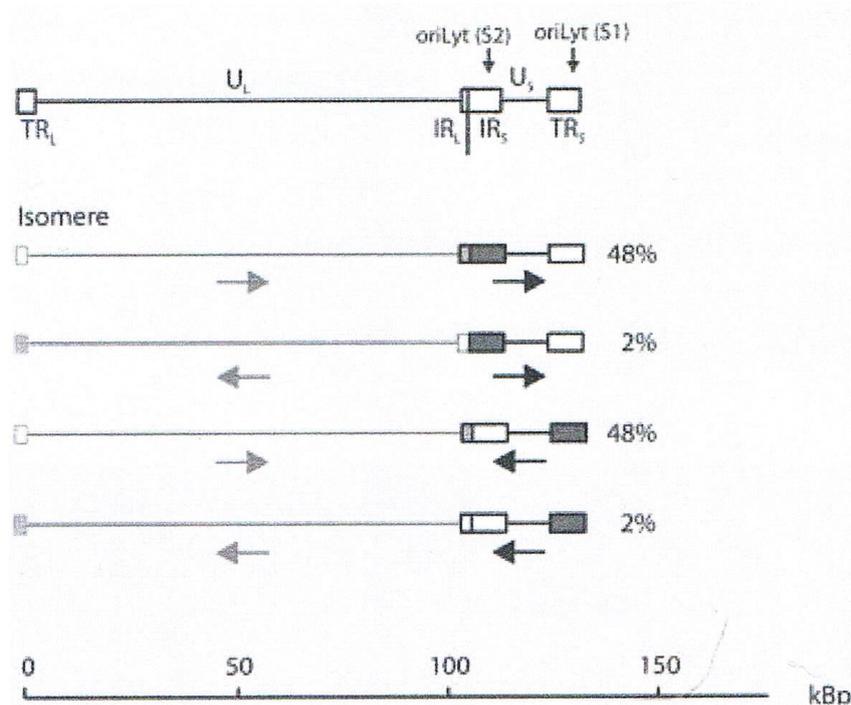


Abb. 2 Genomaufbau des VZV (nach Modrow, Falke, Truyen 2003)
TR terminal repeat; IR internal repeat; L long, S short (Sauerbrei und Wutzler 2004b)

In den 80er Jahren wurde die gesamte DNA des VZV-Referenzstamms *Dumas* sequenziert und publiziert (Davison und Scott 1986). Bei dieser Gesamtgenomsequenzierung wurden 72 offene Leserahmen (ORF) identifiziert, von denen 69 einzeln und drei doppelt vorhanden sind (Tyler et al. 2007). Unter anderem kodieren diese für sechs virale Glykoproteine, Struktur-

proteine und verschiedene Enzyme, wie zum Beispiel die Thymidinkinase (TK) im ORF 36 und die DNA-Polymerase (DNA-Pol) im ORF 28. Dem VZV können nach Breuer et al. (2010) die Genotypen 1 bis 5 zugeteilt werden. Diese Einteilung erfolgte in der Zusammenarbeit dreier Arbeitsgruppen unter Verwendung der Scattered-Single-Nukleotid-Polymorphism-Methode, der Sequenzierung von fünf Glykoproteinen und der Analyse des ORF 22 (Breuer et al. 2010).

2.1.2 Replikationszyklus des Varicella-Zoster-Virus

Der Replikationsvorgang des VZV gliedert sich in mehrere Phasen und wird in Abb. 3 dargestellt. Er beginnt mit der Adsorptionsphase, in der das Virus durch spezifische Wechselwirkungen zwischen viralen Glykoproteinen und zellulären Rezeptoren an die Zelle gebunden wird, sobald es auf die Zelloberfläche trifft. Ein Beispiel dafür ist die Interaktion des Heparan-Sulfat-Proteoglykans mit dem Mannose-6-Phosphat-Rezeptor. Durch bestimmte Fusionsproteine werden die Verschmelzung der Virushülle mit der Zytoplasmamembran und somit auch die Penetration in die Zelle vermittelt, obwohl diese auch durch Endozytose erfolgen kann. Anschließend gelangt das Nukleokapsid ins Zytoplasma und wird mit Hilfe der Mikrotubuli zum Zellkern transportiert. Durch vorhandene Kernporen wird die virale DNA in das Nukleoplasma entlassen. Dort beginnt kaskadenartig die Transkription der unmittelbar frühen (immediate early, IE), der frühen (early, E) und der späten (late, L) Gene. Zuerst werden die IE-Gene durch die zelluläre RNA-Polymerase II transkribiert und darauffolgend im Zytoplasma zu den IE-Proteinen translatiert. Diese bewegen sich erneut in den Zellkern, um dort die Transkription der E-Gene zu initiieren. Zu diesen gehören vor allem Enzyme, die für die DNA-Replikation benötigt werden, wie z.B. die virale DNA-Pol oder DNA-Bindungsproteine, aber auch die TK. Nach der DNA-Replikation werden die L-Gene transkribiert, welche alle strukturellen Komponenten des Virus kodieren. Im Zytoplasma werden die Strukturproteine synthetisiert und darauffolgend im Zellkern zu neuen Kapsiden zusammengesetzt. Darin wird die neu replizierte DNA verpackt.

Den Transport und die Freisetzung der neuen Virionen betreffend, gibt es verschiedene Theorien. Eine besagt, dass die Nukleokapside ihre Envelope beim Durchtritt durch die innere Kernmembran erhalten. Nachdem sie danach die äußere Kernmembran passiert haben, befinden sie sich in Vesikeln. Diese transportieren die Viren zur Plasmamembran, fusionieren mit dieser und entlassen die Viren in den extrazellulären Raum. Eine andere Theorie nach Gershon et al. (1994) besagt, dass die Nukleokapside beim Durchdringen der inneren Kernmembran eine vorübergehende Hülle erhalten und anschließend in das raue

endoplasmatisches Retikulum (rER) gelangen. Diese neue Umhüllung fusioniert mit der Membran des rER, und die nackten Nukleokapside werden in das Zytosol entlassen. Die viralen Glykoproteine werden im rER synthetisiert und danach zum trans-Golgi-Netzwerk (TGN) transportiert. Dort präsentieren sie sich später auf der zytosolischen Oberfläche des TGN. Die vorhandenen Nukleokapside binden sich an die Membran des TGN, und somit befindet sich das glykoproteininhaltige Tegument zwischen Nukleokapsid und äußerer Membran. Die entstehenden Vesikel können nun ebenfalls zur Plasmamembran transportiert werden. Von dort werden die Virionen in den extrazellulären Raum entlassen. Sie können aber auch mit Vakuolen verschmelzen, welche sogenannte Prelysosomen darstellen können. In diesem Fall können die Virionen degradiert und nicht-infektiös werden (Sadzot-Delvaux et al. 1999, Gershon et al. 1994, Braun 2002).

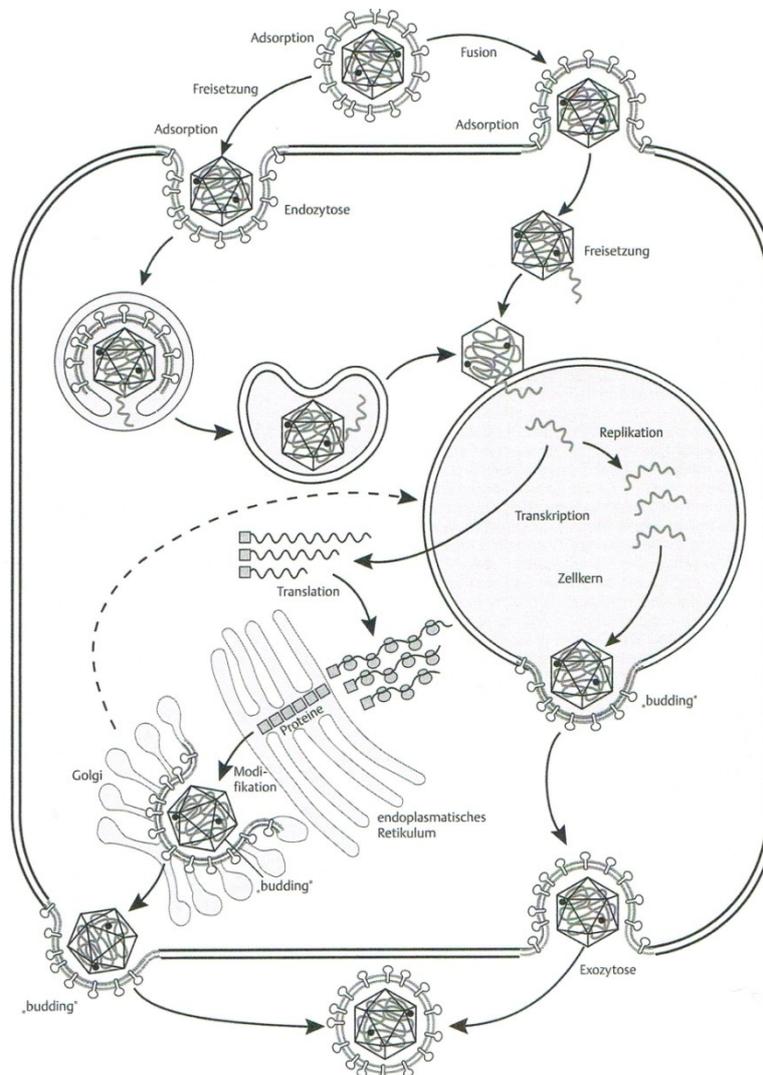


Abb. 3 Schematischer Ablauf der Virusreplikation des VZV (Braun 2002)

2.1.3 Thymidinkinase

Das TK-Gen des VZV wird im ORF 36 kodiert und befindet sich in der langen Untereinheit (Gary et al. 2006). Es enthält 1023 bp und zählt bei den Herpesviren zu den Proteinen, die sehr frühzeitig während des Virusreplikationsprozesses exprimiert werden (Suzutani et al. 1992). Das TK-Protein besteht aus 342 Aminosäuren (AS) mit einem Molekulargewicht von 35 kDa und besitzt sowohl Thymidin- als auch Thymidilat-Phosphorylierungsaktivität. Das Gen enthält zwei konservierte Regionen, welche als Nukleotid (ATP)- und Nukleosid (Substrat)-Bindungsstellen bezeichnet werden. Die Aminosäuren 12 bis 29 bilden die ATP-Bindungsstelle und AS 129 bis 145 die Substrat-Bindungsstelle (Morfin et al. 1999). Der Enzymaufbau ist in Abb. 4 dargestellt. Die Funktion der TK ist die Phosphorylierung von Desoxythymidin zu Desoxythymidinmonophosphat, indem sie die γ -Phosphorylgruppe des ATPs auf die Pyrimidinbase überträgt. Daher spielt das Enzym eine wichtige Rolle beim Aufbau der DNA. Ein wesentlicher Unterschied zwischen der Wirts- und Virus-TK ist, dass dem virusspezifischen Enzym eine größere Auswahl an Substraten zur Verfügung steht. So kann sie außer Desoxythymidin beispielsweise auch Desoxycytidin und Nukleosidanaloga wie Aciclovir (ACV) phosphorylieren (Bird et al. 2003). Mit dieser Erkenntnis entstand auch das große Interesse, das Enzym zur antiviralen Therapie zu nutzen. Bei der TK von Herpesviren sowie anderen Proteinen, die eine ATP-Bindungsstelle besitzen, wurde eine einheitliche Sequenz im Genom gefunden: Gly-X-X-Gly-X-Gly-Lys-Thr. Diese befindet sich zwischen einer β -Faltblattstruktur und einer α -Helix. Durch hochauflösende strukturgebende Verfahren konnte festgestellt werden, dass diese glycinreiche Region eine flexible Schleife bildet und damit die Bindungsstelle für den Phosphatanteil des gebundenen ATPs darstellt (Suzutani et al. 1992).

Wenn in den konservierten Regionen Mutationen mit resultierenden AS-Substitutionen auftreten, kann es zur Reduzierung bzw. zum Verlust der TK-Aktivität führen. Dies kann wiederum Resistenzen gegenüber TK-abhängigen antiviralen Medikamenten, z.B. ACV, zur Folge haben (Talarico et al. 1993).

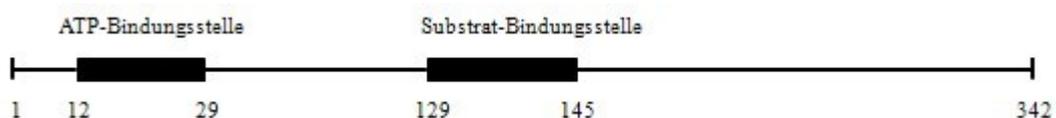


Abb. 4 Struktur der Thymidinkinase mit Angabe der Aminosäurepositionen

2.1.4 DNA-Polymerase

Das virale DNA-Pol-Gen wird genetisch im ORF 28 verschlüsselt und besteht aus 3585 bp, woraus eine Zusammensetzung des Enzyms aus 1195 AS resultiert. Das Gen enthält acht konservierte Regionen (Region I–VII und A), welche in Abb. 5 dargestellt sind. Die Domäne II ist am stärksten konserviert und stellt vermutlich die Pyrophosphat-Bindungsstelle dar. Die Nukleosidbindungsstelle befindet sich höchstwahrscheinlich in der Region III (Visse et al. 1999).

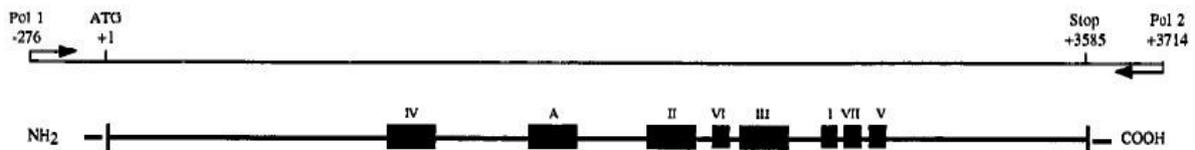


Abb. 5 Struktur des DNA-Polymerasegens (Visse et al. 1999)

Die DNA-Pol spielt eine essentielle Rolle bei der Replikation des VZV. Sie verknüpft einzelne Desoxyribonukleotide zu einem DNA-Molekül, wobei sie einen vorhandenen DNA-Einzelstrang als Matrize nutzt. Dadurch ist sie unbedingt notwendig, um die virale DNA zu replizieren (Meier und Straus 1993).

Da einige antivirale Medikamente, z.B. Foscarnet, nicht über die TK, sondern direkt hemmend auf die DNA-Pol wirken, können auftretende Mutationen im ORF 28 zu Resistenzen gegenüber diesen Virostatika führen. Mutationen des DNA-Pol-Gens können jedoch auch Resistenzen von ACV und anderen Nukleosidanaloga zur Folge haben (Visse et al. 1998).

2.2 Pathogenese, Epidemiologie und Krankheitsbilder der Varicella-Zoster-Virus-Infektion

Das VZV ist ein weltweit vorkommendes, hochkontagiöses Herpesvirus, dessen einziger Wirt der Mensch ist. Zu einer Infektion kommt es durch die Übertragung des Virus über in Luft befindliche Tröpfchen, direkten Kontakt zu Bläscheninhalt (Varizellen, Zoster) bzw. Rachensekret einer infizierten Person oder intrauterin (Varizellen). Bei immunkompetenten Menschen ist etwa eine einstündige Expositionszeit nötig, um das Virus zu übertragen. Immunsupprimierte Personen können allerdings nach bereits zehn Minuten infiziert sein (Färber et al. 2005, McCrary et al. 1999). Der Verlauf der Erkrankung wird stark durch den Zelltropismus des VZV beeinflusst, denn das Virus infiziert ausschließlich Epithelzellen von Haut und Schleimhaut, zirkulierende periphere mononukleäre Zellen und sensorische

Ganglienzellen. Des Weiteren sind Neuronen des peripheren und zentralen Nervensystems (ZNS) betroffen (Quinlivan und Breuer 2005).

Die Primärinfektion des VZV führt zur Ausbildung von Varizellen (Windpocken). Danach verbleibt das VZV latent in Neuronen und Satellitenzellen von Hirnnerven-, Spinal- oder vegetativen Ganglien, von wo aus es bei einer Reaktivierung den Herpes Zoster (HZ) auslöst. Dabei gelangt das Virus über periphere Nerven in die Haut und führt dort zu Effloreszenzen (Oxman 2009). Die Ursachen dafür sind meist ein Nachlassen der immunologischen Abwehrkräfte sowie Störungen des Immunsystems, wie beispielsweise im Alter, bei Immunerkrankungen, Transplantationen oder Krebserkrankungen. Für junge Menschen kann der HZ dadurch das erste Erkennungsmerkmal einer Infektion mit dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) sein (Leppard und Naburi 1998). Ab dem 50. Lebensjahr steigt die Anfälligkeit für einen HZ deutlich an, und unter den 75-Jährigen liegt die Wahrscheinlichkeit, innerhalb eines Jahres an Gürtelrose zu erkranken, bei einem Prozent (Tyring et al. 2007). Eine Möglichkeit, weshalb die Viren während der Latenz in den Neuronen nicht durch immunologische Abwehrzellen bekämpft werden, wäre, dass Neurone nur wenige MHC-Klasse-I-Moleküle exprimieren. Für die endogene Reaktivierung werden zwei verschiedene Pathomechanismen diskutiert. Erstens könnte das Virus während der gesamten Latenzzeit auf niedrigem Niveau repliziert werden. Eine Schwächung des Immunsystems kann dann in einer Virusreaktivierung resultieren. Die zweite Möglichkeit könnte sein, dass die Replikation der DNA im Zellkern während der Latenzzeit durch die zytoplasmatische Restriktion der viralen Proteine nicht möglich ist. Sollte diese aufgehoben werden, wird die Replikation aktiviert, und es kann zu einem Infektionsrezidiv kommen (Wutzler und Sauerbrei 2010). Bei der Untersuchung menschlicher Ganglien, in denen das Virus latent verblieben ist, konnten Transkripte der ORF 4, 21, 29, 62 und 63 gefunden werden. Dabei trat die Abschrift von Gen 63 mit 78% am häufigsten auf. Während einer Latenz kommen virale Genprodukte ausschließlich im Zytoplasma der Neurone vor und erst im Verlauf der Reaktivierung gelangen sie auch in den Zellkern (Cohrs und Gilden 2007).

Das VZV tritt weltweit auf und verhält sich geographisch unterschiedlich. In den gemäßigten Klimazonen steigt die Infektionsrate im Winter und Frühjahr, und die meisten Menschen infizieren sich vor dem Erreichen des zehnten Lebensjahres. Jährlich erkrankten in Deutschland vor Einführung der Impfung im Jahr 2004 etwa 750.000 Personen an Windpocken. Die Durchseuchung steigt innerhalb des ersten Lebensjahres schnell an, sobald der mütterliche Antikörperschutz wegfällt, und mit vier bis fünf Jahren haben ca. 62% der Kinder die Krankheit durchgemacht. Ab einem Alter von zehn Jahren sind es schon 94%, und

mit 40 Jahren wird eine fast 100%ige Durchseuchung erreicht (Sauerbrei und Wutzler 2004b, Wutzler et al. 2001). In tropischen Gebieten tritt das Virus unabhängig von der Jahreszeit auf, und die Durchseuchung setzt erst später ein. Dadurch erreichen dort bis zu 50% der Menschen das Erwachsenenalter, ohne mit Varizellen infiziert zu sein. Die Ursachen dafür sind allerdings noch ungeklärt (Loparev et al. 2007). Das Auftreten der Gürtelrose kann im Gegensatz zu dem der Windpocken keiner besonderen Jahreszeit zugeordnet werden (Färber et al. 2005).

2.2.1 Varizellen

Die Varizellen treten meist im Alter von ein bis neun Jahren auf und verlaufen bei Kindern relativ mild. Bei älteren Personen dagegen wird die Krankheit zwar seltener beobachtet, zeigt dafür aber wesentlich schwerere Verläufe. Sie kann mit Komplikationen, wie z.B. einer Varizellen-Pneumonie, einhergehen. Außerdem können die Varizellen bei immungeschwächten Personen auch innere Organe und das ZNS erfassen (Tunbridge et al. 2008). Weitere Faktoren wie Schwangerschaften, Rauchverhalten und chronische Lungenerkrankungen erhöhen das Risiko einer Pneumonie. Die Letalitätsrate der Varizellen liegt in Deutschland bei 0,027 je 100.000 Personen, und in den USA sterben 1,2/100.000 Säuglinge, 0,5/100.000 Kinder und 31/100.000 Erwachsene an Varizellen (Wieland 2005).

Zu Beginn der Infektion tritt das Virus über die Schleimhaut des oberen Respirationstraktes in den Organismus ein und vermehrt sich im lokalen lymphatischen Gewebe. Während der ersten virämischen Phase vom vierten bis sechsten Tag post infectionem (p.i.) erreicht das an Lymphozyten gebundene Virus die anderen Organe. In Leber, Milz und weiteren Zellen des retikuloendothelialen Systems kommt es anschließend zur starken Virusvermehrung. Nach einer Infektionszeit von zehn bis 14 Tagen beginnt die zweite virämische Phase, in der der gesamte Körper befallen wird und das Virus T-Zell-gebunden die Haut erreicht (Sauerbrei und Wutzler 2004b, Breuer und Whitley 2007). Dort entwickelt sich das typische juckende Hautbild der Windpocken. Das Exanthem beginnt mit roten Makulae, die sich darauffolgend zu kleinen Papeln entwickeln. Daraus bilden sich mehrkammrige dünnwandige Bläschen mit einem Durchmesser von zwei bis fünf Millimetern, die einen wasserklaren Inhalt haben und von einem roten Hof umgeben sind. Durch einschwemmende Leukozyten bilden sich Pusteln, welche bald verschorfen. Nach ca. zwei bis drei Wochen fallen die Krusten ab und hinterlassen in der Regel keine Narben. Da alle verschiedenen exanthematischen Stadien gleichzeitig auftreten, wird der Hautausschlag bei Varizellen als „Sternenhimmel“-Hautbild bezeichnet (Sitzmann 2007), welches in Abb. 6 erkennbar ist. Am stärksten betroffene

Körperteile sind Rumpf, Kopfhaut, Gesicht und proximale Abschnitte der Extremitäten. Typische Symptome einer Windpockenerkrankung sind Fieber, Kopfschmerzen, Unwohlsein und Appetitlosigkeit (Guess et al. 1986, Askalan et al. 2001). Es können aber auch einige Komplikationen auftreten, deren Häufigkeit bis zu ca. fünf Prozent reicht. Am häufigsten sind neurologische Erkrankungen wie Zerebelliten (Häufigkeit ca. 1:5.000), Enzephaliten (Häufigkeit ca. 1:40.000) und seltene Meningiten. Außerdem kann es zu Superinfektionen der Haut, interstitiellen Pneumonien und zu Vaskulopathien kommen (Amlie-Lefond und Jubelt 2009). Bei geimpften Kindern können sogenannte Durchbruchvarizellen auftreten, welche aber im Vergleich zu natürlichen Varizellen deutlich milder verlaufen (Brunell und Argaw 2000).



Abb. 6 Typisches Hautbild einer Varzellenerkrankung
(<http://www.thieme.de/ebooklibrary/inhalte/3130000001/dateien/cl/innere/images/hf0027>)

2.2.2 Herpes Zoster

Durch eine abnehmende Immunabwehr wird das Virus endogen reaktiviert und wandert in einem peripheren Nerv bis zur Hautoberfläche, wo es den HZ auslöst. Dieser tritt vor allem bei älteren, immungeschwächten Menschen auf, und in Deutschland gehört er mit 350.000 Erkrankungen pro Jahr zu den häufigsten Viruserkrankungen der Haut. In den USA leiden ungefähr eine Millionen Menschen im Jahr an der Erkrankung. Bei jungen Menschen ist dieser selten. Von 1000 Kindern erkrankt nur eines pro Jahr an einem HZ. Insgesamt machen aber etwa 20% der Bevölkerung einmal im Leben eine Zostererkrankung durch (Whitley und Gnann 1999, Färber et al. 2005).

Der HZ betrifft meist ein Dermatom, das durch den betreffenden Nerv innerviert wird, kann jedoch auch mehrere Dermatome erfassen. Die mehrere Tage andauernde prodromale Phase ist durch Parästhesie, gefolgt von Dysästhesie gekennzeichnet und kann mit Müdigkeit und leichter Körpertemperaturerhöhung einhergehen. Ein weiteres typisches Symptom ist ein

tagelang anhaltender, stark brennender Schmerz. Nach ein paar Tagen erscheint einseitig ein makulopapulöser Hautausschlag (Weaver 2009). Die Erytheme sind scharf abgegrenzt, oval und leicht erhaben. Sie entwickeln sich nach zwei bis drei Tagen zu wasserklaren Bläschen mit einem Durchmesser von zwei bis fünf Millimetern, deren Inhalt infektiös ist. Die Bläschenbildung hält bis zu fünf Tage an. Weitere zwei bis sieben Tage später kommt es zu einer gelblichen Eintrübung der Bläschen. In der darauffolgenden Woche bilden sich bräunliche Krusten, welche zuerst fest haften und anschließend abfallen. Normalerweise ist der Zoster bei immungesunden Patienten nach zwei bis vier Wochen ausgeheilt. Bei immungeschwächten Personen hat er meist einen schwereren Verlauf und führt häufiger zu Komplikationen (Wutzler und Sauerbrei 2010, Wieland 2005). Der Zoster kann alle Hautdermatome betreffen, tritt aber am häufigsten in thorakalen (50%) und kranialen (15%) Bereichen auf (Whitley und Gnann 1999). Da er meist die Form eines „Halbgürtels“ besitzt, wird er auch als Gürtelrose bezeichnet. Sollte das Virus im Bereich des Trigeminiervus reaktiviert werden, entsteht ein sogenannter Zoster trigeminus. Wenn dieser das Auge betrifft, wird die Erkrankung als Zoster ophtalmicus bezeichnet, welcher zu Blindheit führen kann, wenn er unbehandelt bleibt. Der Fall eines Zoster ophtalmicus ist in Abb. 7 dargestellt (Carroll und Mastaglia 1979). Falls der Nervus facialis betroffen ist, können die ipsilateralen Gesichtsmuskeln geschwächt oder sogar gelähmt werden, und zusätzlich kann dabei ein Ausschlag im äußeren Gehörgang, am Trommelfell und auf der Zunge auftreten (Sweeney und Gilden 2001).

Im Rahmen einer HZ-Erkrankung können akute Komplikationen wie hämorrhagische und nekrotische Hautveränderungen, bakterielle Superinfektionen, Enzephaliten oder Meningiten auftreten. Durch Disseminierung kann sich die Erkrankung bis zum Zoster generalisatus entwickeln. Außerdem ist es möglich, dass motorische und sensorische Nervenwurzeln degenerieren. Nach dem Verheilen der Gürtelrose können weiterhin starke brennende und stechende Schmerzen im Versorgungsgebiet des betroffenen Nervs auftreten. Halten diese länger als vier Wochen an oder treten nach einem schmerzfreien Intervall erneut auf, wird diese häufige Komplikation postzosterische Neuralgie (PZN) genannt. Verantwortlich für viele sensorische Abnormalitäten während der PZN könnte zum einen der Tod primärer Neuronen im betroffenen sensorischen Ganglion und sekundärer im Hinterhorn des Rückenmarks während des akuten HZ sein. Ein anderer möglicher Pathomechanismus wäre die periphere Sensibilisierung von nozizeptiven C-Fasern, der eine zentrale Sensibilisierung spinaler nozizeptiver Neurone folgt (Oxman 2009, Sauerbrei und Wutzler 2004b). Die Häufigkeit und Stärke der PZN steigt mit zunehmendem Alter an, und Patienten über 50 Jahre

erleiden zu 25 bis 50% diese Komplikation (Tyring et al. 2007). Insgesamt kann gesagt werden, dass 10 bis 18% der Patienten, die an HZ erkranken, später auch an einer PZN leiden (Schencking et al. 2010).



Abb. 7 Bläschenexanthem eines Herpes ophthalmicus
(<http://e-learning.studmed.unibe.ch/augenheilkunde/systematik/lid/images/guertelrose2.jpg>)

2.2.3 Varicella-Zoster-Virus-Infektionen während einer Schwangerschaft

Während einer Schwangerschaft ist es möglich, dass sich die Mutter mit dem VZV infiziert, wenn sie keine Antikörper besitzt bzw. noch keine Varizellen durchgemacht hat. Dies kann zu Schädigungen des Kindes führen. Entscheidend dafür, wie stark das Ungeborene betroffen ist, ist der Zeitpunkt der Infektion. Liegt dieser innerhalb des ersten oder zweiten Schwangerschaftsdrittels, kommt es mit einer Wahrscheinlichkeit von 25% zu einer intrauterinen Virusübertragung auf den Fetus. Die Infektion kann dann entweder asymptomatisch verlaufen, einen Abort nach sich ziehen oder sich bis zum fetalen Varzellensyndrom entwickeln (Gabler-Sandberger 2000, Wutzler und Sauerbrei 2007). Letzteres ist durch Hautveränderungen, Hypoplasien der Extremitäten sowie Schäden des ZNS und der Augen charakterisiert. Das Risiko liegt bis zur 20. Schwangerschaftswoche (SSW) bei ein bis zwei Prozent, und das Syndrom führt bei ca. 30% der erkrankten Kinder zum Tod (Sauerbrei und Wutzler 2000). Erkrankt eine Schwangere zwischen dem fünften Tag vor und dem zweiten Tag nach der Entbindung an Windpocken, so entwickeln sich beim Neugeborenen mit einer Wahrscheinlichkeit von 17 bis 30% neonatale Varizellen (Gardella und Brown 2007). Gründe dafür sind der fehlende Schutz durch mütterliche Antikörper und das unreife Immunsystem des Säuglings. Ohne antivirale Therapie liegt die Sterberate für diese betroffenen Kinder bei 30% (Sauerbrei und Wutzler 2005). Durch eine frühzeitige antivirale Therapie mit ACV sowie eine Prophylaxe mit Varicella-Zoster-Immunglobulin

kann die Letalität deutlich gesenkt werden (Sauerbrei und Wutzler 2001). Treten die neonatalen Varizellen erst nach dem zwölften Lebenstag auf, wurde das Virus mit hoher Wahrscheinlichkeit exogen erworben und stellt keine Lebensbedrohung dar, falls das Kind nicht zu früh geboren wurde (Wutzler und Sauerbrei 2007). Wenn sich eine schwangere Frau erst im letzten Trimenon infiziert, tritt mit 20% Wahrscheinlichkeit eine Varizellenpneumonie auf. Erste Anzeichen dafür sind Husten mit eventuellem Blutauswurf, Kurzatmigkeit und Brustschmerzen. Diese Symptome werden etwa vier Tage nach dem ersten Hautauschlag festgestellt. Meist wird die Pneumonie nach ca. sieben Tagen überwunden. Da jedoch lebensbedrohliche Verläufe nicht selten sind, werden die Patientinnen stationär im Krankenhaus überwacht und mit ACV behandelt. Dazu werden über zehn Tage dreimal täglich 10 mg/kg KG ACV i.v. appliziert. Die Letalität kann auf diese Weise signifikant reduziert werden (Sauerbrei und Wutzler 2005). Um dem Risiko einer VZV-Infektion während der Schwangerschaft vorzubeugen, sollten sich alle für Varizellen empfänglichen Frauen impfen lassen.

Im Gegensatz zu Varizellen besteht keine Gefahr für das Kind, wenn die Mutter an einem HZ erkrankt (Gardella und Brown 2007, Mueller et al. 2008, Sauerbrei und Wutzler 2000, Daley et al. 2008).

2.3 Diagnostik, Prophylaxe und Therapie der Varicella-Zoster-Virus-Infektion

2.3.1 Diagnostik

Aufgrund des typischen Krankheitsbildes werden Varizellen und HZ in der Regel klinisch diagnostiziert. Bei einer untypischen klinischen Symptomatik, z.B. unter Immunsuppression, beim Auftreten von Komplikationen sowie bei Infektionen während der Schwangerschaft und bei Neugeborenen, ist eine Labordiagnose aber von großer Bedeutung. Im Vordergrund steht der Virusnachweis, wofür verschiedene Methoden verfügbar sind. Dabei hat sich die Polymerasekettenreaktion (PCR) als Methode der Wahl erwiesen (Sauerbrei und Wutzler 2004a). Es können spezifische Oligonukleotide der ORF 4, 13, 28, 29, 36, 62, 63 und 68 genutzt werden (Puchhammer-Stöckl et al. 1991, Sauerbrei und Wutzler 2004b). Die PCR-Produkte können dann mittels Agarosegelelektrophorese aufgezeigt werden. Dieses Verfahren liefert ein schnelles Ergebnis und besitzt eine hohe Sensitivität und Spezifität. Eine preiswertere und ebenfalls häufig eingesetzte Methode ist der Virusdirektnachweis, der beispielsweise durch einen Immunfluoreszenztest mit monoklonalen Antikörpern möglich ist. Weiterhin kann eine Virusisolierung in Zellkulturen erfolgen. Dafür wird das VZV in Zellen

von Menschen oder Affen, z.B. in humanen embryonalen Lungenfibroblasten, angezüchtet. Die Identifizierung erfolgt danach ebenfalls mittels monoklonaler Antikörper im Fluoreszenztest. Die Virusanzucht ist sehr zeitaufwendig, da bis zum Auftreten der ersten zytopathischen Effekte (cpE) mindestens zwei bis drei Tage vergehen. Außerdem ist für die Durchführung viel Erfahrung notwendig. Ein weiterer Grund, weshalb die Sensitivität nur 20 bis 40% (Sauerbrei et al. 2002) beträgt, ist, dass sich nicht jeder VZV-Stamm kultivieren lässt und somit nicht immer eine Diagnose möglich ist. Seit Einführung der Varizellenimpfung ist es wichtig, zwischen Impftyp- und Wildtyp-VZV-Stämmen unterscheiden zu können. Diese Differenzierung erfolgt durch Genotypisierung mittels Amplifikation der ORF 38 und 62. Daran schließt sich eine Restriktionsenzymanalyse an (Sauerbrei et al. 2003b, Sauerbrei et al. 2003a). Aufwendiger ist die VZV-Genotypisierung mittels Sequenzierung (Sauerbrei et al. 2008). Eine VZV-Diagnostik ist auch durch Antikörpernachweise möglich. Der Bestimmung des Immunstatus dient in erster Linie der Fluoreszenz-Antikörper-Membran-Antigen (FAMA)-Test, welcher VZV-Glykoprotein-spezifische Antikörper nachweist (Sauerbrei et al. 2004). Diese Glykoproteine lassen sich auch durch den Neutralisationstest bestätigen. Durch die Methoden des Enzyme-linked-Immunsorbent-Assays (ELISA) und des Immunfluoreszenztests lassen sich Antikörper gegen verschiedene Immunglobulin (Ig)-Klassen nachweisen. Anti-VZV-IgM bestätigen eine aktive VZV-Infektion. Anti-VZV-IgA-Antikörper werden zur Diagnose des HZ eingesetzt (Sauerbrei et al. 1999). Durch den Nachweis von intrathekalen VZV-IgG-Antikörpern ist die retrospektive Diagnostik einer ZNS-Infektion möglich (Sauerbrei et al. 2002, Bezold et al. 2001, Sauerbrei et al. 1999, Puchhammer-Stöckl et al. 1991).

2.3.2 Prophylaxe

Die Windpocken gelten in den gemäßigten Klimazonen als häufigste impfpräventable Virusinfektion im Kindesalter (Wutzler et al. 2002). Dadurch stellt die Varizellenimpfung eine wichtige Möglichkeit der VZV-Prophylaxe dar. Im Jahr 1974 wurde in Japan bei einem dreijährigen Jungen aus Bläscheninhalt ein VZV-Wildtyp-Stamm gewonnen und nach dem Familiennamen des Jungen mit „Oka“ benannt. Durch Abschwächung der Virulenz des Virus mittels serienmäßiger Passagierung in humanen embryonale Lungenfibroblasten und embryonalen Zellkulturen von Meerschweinchen konnte ein Impfstamm *vOka* entwickelt werden (Takahashi et al. 1974, Vazquez et al. 2001). Heute stehen zwei Lebendimpfstoffe zur Verfügung. Zum einen Varilrix[®] der Firma GlaxoSmithKline (Uxbridge, Großbritannien) und zum anderen Varivax[®] der Firma Sanofi Pasteur MSD (Lyon, Frankreich). Die Effizienz

dieser Impfungen ist hervorragend und führt bei gesunden Menschen zu einer Serokonversionsrate von mehr als 97% (Färber et al. 2005). Bei immungeschwächten Personen wird eine Rate von 80 bis 90% erreicht. In Deutschland wurde die Varizellenimpfung im Juli 2004 durch die Ständige Impfkommission am Robert Koch-Institut (STIKO) zur Standardimpfung für alle Kinder zwischen elf und 14 Monaten erklärt. Dabei wird meist der Vierfachimpfstoff Priorix-Tetra[®] der Firma GlaxoSmithKline (Uxbridge, Großbritannien) verwendet, der Schutz gegen Mumps, Masern, Röteln und Varizellen bietet. Empfohlen wird die Varizellenimpfung auch allen älteren Kindern ohne Varizellenanamnese, seronegativen Frauen mit Kinderwunsch und empfänglichen Patienten mit einer Immunsuppression. Die Immunisierung erfolgt bei den Kleinkindern in zwei Dosen, welche im Alter von elf bis 14 und 15 bis 23 Monaten verabreicht werden. Ältere seronegative Personen erhalten ebenfalls zwei Impfdosen, zwischen denen ein Abstand von mindestens vier Wochen liegen soll (Sauerbrei 2006). Zur Postexpositionsprophylaxe wird eine Inkubationsimpfung innerhalb der ersten fünf Tage nach Exposition empfohlen (STIKO 2010). In einer Studie aus Japan wurde gezeigt, dass der Impfschutz auch nach 20 Jahren noch ausreichend vorliegt, und mit einer Durchimpfungsrate von 85% könnten die Varizellen sogar in einem Zeitraum von weniger als 20 Jahren eliminiert werden (Wutzler et al. 2002).

Zur Prävention des HZ wurde im Jahre 2006 ein attenuierter Lebendimpfstoff durch die europäische Arzneimittelagentur European Medicines Agency (EMA) und die amerikanische Food and Drug Administration (FDA) zugelassen, der als Zostavax[®] der Firmen Sanofi Pasteur MSD (Lyon, Frankreich) oder Merck & Co. INC (USA) im Handel erhältlich ist. Dieser wird ebenfalls aus dem *Oka*-Stamm gewonnen, ist aber 14mal stärker dosiert und verstärkt so die VZV-spezifische Immunantwort. Die Impfung reduziert die Anzahl der Zostererkrankungen nach Oxman et al. (2005) um 51%, senkt die Schwere der Krankheit um 73% und die Gefahr einer PZN um 67%. Insgesamt wird der „Burden of Illness“, ein Kombinationsmaß aus Schwere, Dauer und Häufigkeit einer Erkrankung, um 61% verringert (Megged und Schlesinger 2009, Tyring et al. 2007).

Eine zweite Möglichkeit der VZV-Prophylaxe ist die passive Immunisierung mit einem spezifischen Varicella-Zoster-Immunglobulin, welches zu 0,5 ml/kg KG intramuskulär (i.m.) oder 1 ml/kg KG i.v. dosiert werden muss. Der Schutz hält ungefähr 14 bis 28 Tage an. Diese Variante wird vor allem für Risikopatienten genutzt, zu denen ungeimpfte Schwangere ohne Varizellenanamnese, immundefiziente Personen mit fehlender oder unbekannter Varizellenanamnese und Neugeborene, deren Mütter fünf Tage vor bis zwei Tage nach der Entbindung an Varizellen erkrankten, gehören (STIKO 2010).

2.3.3 Therapie

Bei immungesunden Kindern werden Windpocken im Allgemeinen nur rein symptomatisch behandelt. Indikationen für eine antivirale Therapie, die meist mit ACV erfolgt, sind neonatale Varizellen, Varizellen bei Neugeborenen und bei immunsupprimierten Kindern (Arvin 2002, Heuchan und Isaacs 2001, Huang et al. 2001). Außerdem werden alle Komplikationen, vor allem neurologische und die Varizellen-Pneumonie, antiviral therapiert. Für eine erfolgreiche Therapie des HZ und der Vorbeugung möglicher Komplikationen sollte die antivirale Medikation möglichst innerhalb von 72 Stunden nach dem Auftreten der ersten Symptome begonnen werden (Mustafa et al. 2009). Eine antivirale Behandlung des HZ erfolgt in jedem Fall bei Patienten ab dem 50. Lebensjahr, einem Zoster im Kopf- und Halsbereich, bei immungeschwächten Patienten, sehr schweren Verläufen des Zosters, bei Patienten mit Dermatitis atopica und großen Ekzemen sowie bei Kindern und Jugendlichen, die einer Dauertherapie mit Salicylaten oder Kortikosteroiden unterliegen (Mueller et al. 2008, Sauerbrei und Wutzler 2004b). Virostatika verringern die Stärke des Schmerzes und verkürzen die Dauer der Abheilung. Eine Ergänzung der Behandlung des HZ mit Kortikosteroiden ist möglich, da der Zosterschmerz dadurch ebenfalls verringert und die Schmerzdauer reduziert wird. Außerdem vermindern die Virostatika die Schädigung der Neurone und verkürzen dadurch die Schwere und Dauer einer PZN (Whitley et al. 1996, Opstelten et al. 2008). Zur Schmerztherapie einer PZN werden zusätzlich Opioide, trizyklische Antidepressiva und Antikonvulsiva eingesetzt (Dworkin und Schmader 2003, Kost und Straus 1996, Rowbotham et al. 1998).

Die derzeit zur Verfügung stehenden antiviralen Medikamente zur Behandlung einer VZV-Infektion sind ACV, Valaciclovir (Valylester-Prodrug von ACV), Penciclovir (PCV), Famciclovir (Valylester-Prodrug von PCV), Brivudin (BVDU), Foscarnet (TPF) und Cidofovir (CDV) (De Clercq 2004). Letzteres ist allerdings nur für Infektionen mit dem CMV und nicht für VZV-Erkrankungen zugelassen. Dadurch kann es nur nach Aufklärung des Patienten und dessen Einwilligung eingesetzt werden. Der Tabelle (Tab.) 1 kann die jeweilige Dosierung und Behandlungsdauer der Medikamente entnommen werden, und in Abb. 8 sind die chemischen Strukturen dargestellt.

Tab. 1 Medikamente zur antiviralen Therapie von VZV-Infektionen

Medikament	Dosierung	Behandlungsdauer
Aciclovir (oral) (Zovirax®)	5 x täglich 800 mg	7 Tage
Aciclovir (i.v.)	3 x täglich 10 mg/kg KG	5 Tage
Valaciclovir (oral) (Valtrex®)	3 x täglich 1000 mg	7 Tage
Famciclovir (oral) (Famvir®)	alle 8 h 500 mg	7 Tage
Brivudin (oral) (Zostex®)	1 x täglich 125 mg	7 Tage
Foscarnet (i.v.) (Foscavir®)	3 x täglich 40 mg/kg KG oder 2x täglich 60 mg/kg KG	10 Tage
Cidofovir (i.v.) (Vistide®)	1 x wöchentlich 5 mg/kg KG	Beginn: 2 Wochen 2 Wochen Pause Später: alle 2 Wochen

KG: Körpergewicht

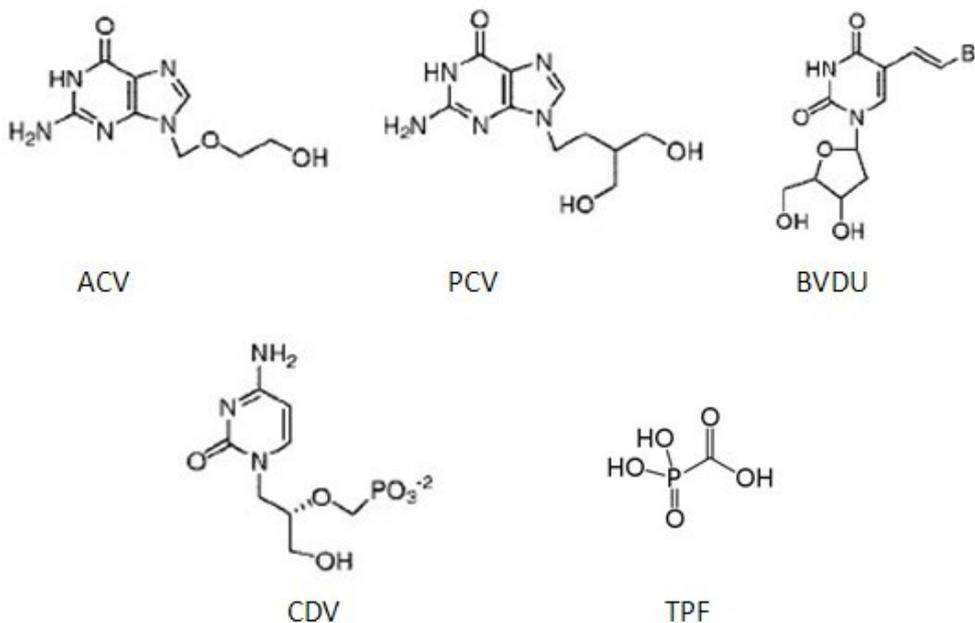


Abb. 8 Chemische Strukturen der Virostatika (Focher et al. 2007)

ACV: Aciclovir, PCV: Penciclovir, BVDU: (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridin,
CDV: Cidofovir, TPF: Foscarnet

Außer TPF und CDV sind all diese Stoffe Nucleosidanaloga und werden zuerst spezifisch durch die virale TK zur Monophosphatform phosphoryliert. Bei ACV und PCV erfolgen die zweite und dritte Phosphorylierung durch zelluläre Kinasen, wogegen BVDU das zweite Mal erneut durch die virale TK phosphoryliert wird. Die Triphosphate der Analoga hemmen die virale DNA-Pol kompetitiv, wenn sie in die DNA eingebaut werden sollen, und führen dadurch zu einem frühzeitigen Kettenabbruch (Saint-Léger et al. 2001, Talarico et al. 1993, De Clercq 2001, Lüllmann et al. 2006). ACV konkurriert mit Deoxyguanosin-Triphosphat als Substrat für die DNA-Pol, und da ihm die 3'-Hydroxylgruppe fehlt, kann die Elongation nicht

fortgesetzt werden. Die Toxizität von ACV ist sehr gering, da es von der zellulären TK kaum als Substrat verwendet wird (Whitley und Gnann 1999). Da die orale Bioverfügbarkeit von ACV nur 30% beträgt, wird es zur Behandlung immunsupprimierter Patienten parenteral appliziert, um die Bioverfügbarkeit zu steigern. Im Vergleich dazu besitzt Valaciclovir eine höhere orale Bioverfügbarkeit und Halbwertszeit, weshalb es effektiver wirkt und oft bevorzugt in der Therapie angewendet wird (Weller et al. 1993). Famciclovir ist ebenso ein wirkungsvolles und gut verträgliches Medikament, welches sehr rasch nach der oralen Verabreichung absorbiert wird und zusätzlich schneller zur Auflösung des Zoster-assoziierten Schmerzes führt als ACV (Degreef 1994). Als ein weiteres oral appliziertes Nukleosid-analogon kann BVDU sehr erfolgreich in der Behandlung eines HZ angewendet werden. Es zeigt in vitro eine stärkere Wirksamkeit als ACV (Shigeta et al. 1983). Ein weiterer Vorteil ist, dass es nur einmal täglich eingenommen werden muss. Es sollte aber beachtet werden, dass BVDU nicht an Personen gegeben wird, die gleichzeitig mit 5-Fluorouracil (5-FU) therapiert werden, wie es oft bei Tumorpatienten der Fall ist. Dabei kann es zu Wechselwirkungen kommen, die den Abbau des 5-FU hemmen. Als Resultat kann es zu einer toxischen Anreicherung des Stoffes kommen, welche bis zum Tod führen kann (De Clercq 2005).

Foscarnet verhält sich im Unterschied zu den bisher beschriebenen Virostatika TK-unabhängig und wirkt als Pyrophosphatantagonist direkt auf die virale DNA-Pol. Es bildet einen Komplex mit der Pyrophosphatbindungsstelle des Enzyms, sodass dNTPs nicht mehr gespalten werden können. Die virale DNA-Pol wird dadurch nicht-kompetitiv gehemmt (Chrisp und Clissold 1991). Durch die Umgehung der TK-abhängigen Phosphorylation wird TPF als Mittel der Wahl genutzt, um ACV-resistente VZV-Infektionen zu behandeln. Es muss täglich verabreicht werden und führt zu einer hohen toxischen Belastung der Niere. Es ist daher bei einer Niereninsuffizienz kontraindiziert. Des Weiteren ist Foscarnet nur zur intravenösen Behandlung vorgesehen (Hatchette et al. 2008, Lüllmann et al. 2006).

Cidofovir ist ein azyklisches Nukleosidphosphat und leitet sich vom Cytidintriphosphat ab. Es ist ebenfalls TK-unabhängig und wird direkt von zellulären Enzymen in die diphosphorylierte Form umgewandelt. Diese ist dann in der Lage, die virale DNA-Pol zu hemmen. Cidofovir wird intravenös (i.v.) appliziert und durch die lange Halbwertszeit sind Behandlungsabstände von ein bis zwei Wochen ausreichend. Mit diesem Medikament können sowohl ACV-, als auch TPF-resistente VZV-Infektionen behandelt werden (Snoeck et al. 2000).

Resistenzen gegenüber den antiviralen Substanzen entstehen meist durch Mutationen im TK- oder seltener durch Veränderungen im DNA-Pol-Gen. Es ist aber durchaus möglich, dass die

Behandlung eines HZ mit ACV länger als zehn Tage notwendig ist, was jedoch nicht unmittelbar mit einer Resistenz im Zusammenhang stehen muss (Saint-Léger et al. 2001).

Eine neue Gruppe hochselektiver Pharmaka gegen das VZV sind bityklische Nukleosidanaloga (BCNA). Die Besonderheit dieser Medikamente ist die außergewöhnlich hohe Lipophilität, welche zu einer sehr guten Aufnahme in die Zelle führt. Außerdem sind sie sehr wirkspezifisch, und es sind nur geringe Dosierungen nötig. In vitro sind diese Analoga auch in hohen Konzentrationen nicht toxisch. Deshalb wird davon ausgegangen, dass es auch in vivo keine toxischen Nebenwirkungen gibt. Um eine ausreichend hohe orale Bioverfügbarkeit zu erreichen, werden Prodrug-Formen der BCNA verwendet. Ein Beispiel ist Cf1743. Sein 5'-Valylester heißt FV100, ist stabil, wasserlöslich und hat eine gute Bioverfügbarkeit. Dieses Medikament kann medizinisch eingesetzt werden und ist bereits in die zweite kontrollierte Phase der Medikamententestung eingegangen. Die Struktur von Cf1743 und FV100 wird in Abb. 9 dargestellt (McGuigan und Balzarini 2009).

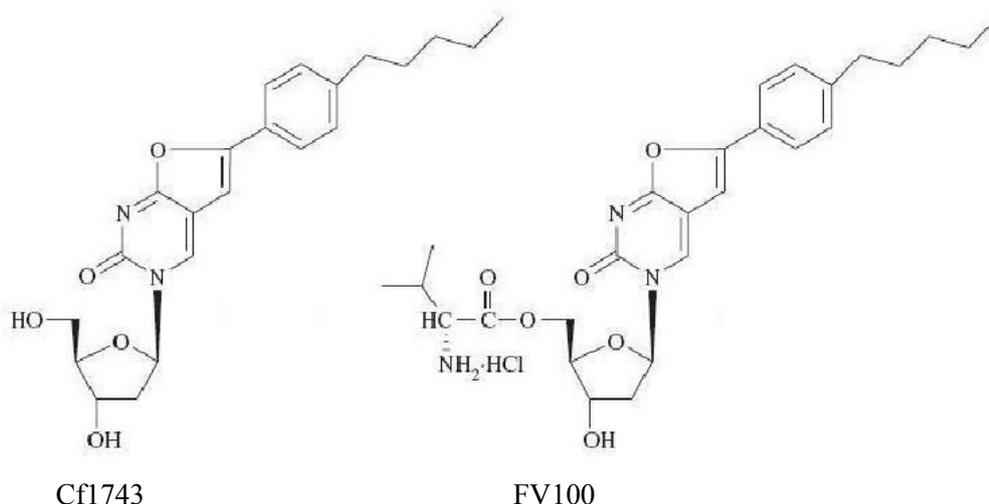


Abb. 9 Chemische Struktur der BCNA Cf1743 und seiner klinischen oralen Vorform FV100

2.3.4 Resistenzen des *Varicella-Zoster-Virus* gegenüber Virostatika

Während einer langanhaltenden antiviralen Therapie, vor allem bei immunsupprimierten Patienten, kann es zur Ausbildung von Resistenzen gegenüber den Virostatika kommen (Ida et al. 1999). Ursache dafür ist die Entstehung von Mutationen im TK- oder im DNA-Pol-Gen. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine ACV-Resistenz durch Veränderungen des TK-Gens entsteht, liegt bei 95 % (Hatchette et al. 2008). Durch auftretende Variationen im Genom kann es zur Reduzierung bzw. zum Verlust der viralen TK-Aktivität kommen. Außerdem ist es möglich, dass die Substratspezifität verringert wird (Andrei et al. 2004).

Mutationen, die zu einer Resistenz führen, können sich im gesamten TK-Gen befinden. Allerdings gibt es drei Regionen, wo sie verstärkt auftreten. Das sind die ATP-Bindungsstelle (AS 12 bis 29), die Nukleosid-Bindungsstelle (AS 129 bis 145) und die AS 231 (Morfin et al. 1999). Im Falle einer Nukleotidsubstitution, -addition oder -deletion, die eine Frameshift-Mutation zur Folge hat, entsteht meist ein frühzeitiges Stopp-Codon, welches zu einem verkürzten TK-Protein mit eingeschränkter oder fehlender Enzymaktivität führt (Boivin et al. 1994). Aber auch einzelne AS-Substitutionen können ein Aktivitätsverlust verursachen und somit zu einer Resistenz führen (Sawyer et al. 1988). Die verbleibenden fünf Prozent der ACV-Resistenzen beruhen auf Veränderungen im DNA-Pol-Gen. Von Mutationen betroffen sind dabei meist die konservierten Regionen, vor allem die Domänen II und III. Das Auftreten einer TPF-Resistenz beruht auch auf Veränderung in diesem Gen (Kamiyama et al. 2001). Jedoch ist sie sehr selten und es wurde bislang nur der Fall eines AIDS-Patienten mit solch einer TPF-Resistenz veröffentlicht (Visse et al. 1998). Resistenzen gegenüber ACV kommen zwar etwas häufiger vor, wurden aber in der Literatur bis jetzt auch relativ selten beschrieben. Entsprechend der Empfindlichkeit gegenüber ACV lassen sich die VZV-Stämme zunächst in zwei Gruppen unterteilen. Zum einen in sensitive Stämme, die phänotypisch ACV-empfindlich sind, keine Resistenzmutationen aufweisen und gut antiviral behandelt werden können. Zum anderen in ACV-resistente Virusstämme, welche Resistenz-verursachende Mutationen enthalten und phänotypisch resistent sind. Wenn gewöhnlich im Vorfeld einer Resistenztestung die VZV-Erkrankung nicht auf eine ACV-Therapie reagiert, wird von einer klinischen Resistenz gesprochen. Diese kann verschieden definiert sein. Zum einen kann das Fortbestehen der Hautläsionen nach zehntägiger antiviraler Therapie bereits als klinische Resistenz angesehen werden (Safrin et al. 1991). Zum anderen ist nach Saint-Léger et al. (2001) erst ab dem 21. Behandlungstag von einer Resistenz zu sprechen.

Die Resistenzbestimmung kann mit Hilfe verschiedener Methoden durchgeführt werden. Die phänotypische Untersuchung eines möglicherweise resistenten VZV-Stamms erfolgt mittels des Plaquereduktionstests, bei welchem die 50%igen inhibitorischen Konzentrationen verschiedener antiviraler Substanzen im Vergleich zu einem sensitiven Referenzstamm bestimmt werden. Zwar liefert diese Methode eine eindeutige Aussage, jedoch ist dazu die VZV-Isolierung in Zellkulturen notwendig, welche schwierig und in vielen Fällen nicht möglich ist (s. 2.3.1) (Hasegawa et al. 1995). Um die Resistenz genotypisch nachzuweisen, wird eine Sequenzierung des viralen TK- und DNA-Pol-Gens durchgeführt. Somit können vorhandene Mutationen, welche die Resistenz verursachen, nachgewiesen werden. Allerdings wurden mit dieser Methode bislang wenige Erfahrungen gemacht und auch nur wenige

Studien in der Literatur publiziert (Hatchette et al. 2008, Ida et al. 1999).

3. Zielstellung

Wenn eine VZV-Infektion innerhalb von zehn Tagen nicht erfolgreich mit antiviralen Medikamenten wie ACV behandelt werden kann, entsteht der Verdacht auf eine klinische ACV-Resistenz. Davon sind vor allem Patienten mit einem eingeschränkten Immunsystem betroffen. Der zweifelsfreie Beweis für eine Resistenz kann nur mit virologischen Methoden erbracht werden. Dabei besteht die Möglichkeit einer Resistenztestung, die sowohl phäno- als auch genotypisch durchgeführt werden kann. Da die phänotypische Resistenzbestimmung beim VZV nur eingeschränkt möglich ist, sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit bevorzugt genotypische Testmethoden erstellt werden und zur Anwendung kommen.

In dieser Arbeit wurden 59 klinische VZV-Stämme auf das Vorhandensein einer ACV-Resistenz getestet. Um die phänotypischen Untersuchungen durchführen zu können, wurde versucht, die Virusstämme zunächst in humanen embryonalen Lungenfibroblasten anzuzüchten und anschließend die Empfindlichkeit gegenüber antiviralen Medikamenten mittels des Plaquereduktionstests zu ermitteln. Dazu sollten die 50%igen Hemmkonzentrationen (IC_{50} -Wert) der getesteten antiviralen Substanzen, wie beispielsweise ACV, im Vergleich zu einem sensitiven Referenzstamm erfolgen. Zur genotypischen Resistenzbestimmung diente die Suche nach Genpolymorphismen bzw. Mutationen im TK-Gen (ORF 36) und im DNA-Pol-Gen (ORF 28) des VZV. Dies setzte die Amplifikation und Sequenzierung dieser Gene voraus. Die Auswahl dieser Genomausschnitte basiert darauf, dass die derzeit verwendeten Virostatika über die darin kodierten Enzyme wirken. Auftretende Mutationen, welche eine Veränderung der AS-Zusammensetzung der Proteine verursachen, könnten daher eine Resistenz erklären. Die untersuchten VZV-Stämme lassen sich in zwei Gruppen untergliedern. Zum einen Stämme, die von Patienten ohne bekannte antivirale Therapie stammen und gewöhnlich ACV-sensitiv sind. Sie reagieren phänotypisch empfindlich auf ACV, und ihre Genomveränderungen können dem natürlichen Genpolymorphismus zugeordnet werden. Zum anderen wurden Virusstämme von Patienten mit klinisch resistenten VZV-Infektionen getestet. Dabei wurden ebenfalls die phänotypische, soweit diese möglich war, und die genotypische Resistenzbestimmung durchgeführt. Ausgewählte Mutationen können als potentielle Ursachen einer ACV-Resistenz angesehen werden. Mit diesen Untersuchungen sollten die bislang limitierten Kenntnisse und Erfahrungen zur Resistenztestung des VZV erweitert werden.

4. Material und Methoden

4.1 Patienten

In die vorliegende Arbeit wurde das Untersuchungsmaterial von 59 Patienten einbezogen. Es war am Institut für Virologie und Antivirale Therapie in Jahren 2000 bis 2010 archiviert worden. Die klinische Diagnose lautete bei 28 Patienten Varizellen und bei 31 Patienten Zoster. Unter den Zoster-Patienten befanden sich zehn mit klinischem Verdacht auf eine ACV-Resistenz. Jedem Untersuchungsmaterial wurde eine Labornummer zugewiesen, mit der es im gesamten weiteren Verlauf der Arbeit bezeichnet wurde.

Alter und Geschlecht der Patienten

In den folgenden zwei Tabellen werden Alter und Geschlecht der Patienten dargestellt. Tab. 2 fasst die Personen mit Varizellen zusammen, die zwischen einem und 37 Jahre alt waren. Tab. 3 stellt die Verteilung der Zoster-Patienten dar, welche ein Alter von drei bis 86 Jahren hatten. Das mittlere Alter betrug für die Varizellen-Patienten 7,6 und für die Patienten mit Zoster 38,5 Jahre. Insgesamt handelte es sich um 25 weibliche Personen, von denen 11 Varizellen- und 14 Zoster-Patienten waren. Unter den 33 männlichen Patienten waren 16 Personen mit Varizellen, und bei den verbleibenden 17 wurde ein Zoster diagnostiziert. Das Geschlecht eines Patienten war unbekannt.

Tab. 2 Alter und Geschlecht der Patienten mit Varizellen

Alter der Patienten in Jahren	Anzahl der Patienten	weiblich	männlich	Unbekanntes Geschlecht
0 – 10	24	10	13	1
11 – 20	1	1	0	0
31 – 40	3	0	3	0
Σ	28	11	16	1

Tab. 3 Alter und Geschlecht der Patienten mit Zoster

Alter der Patienten in Jahren	Anzahl der Patienten	weiblich	männlich
0 – 10	5	2	3
11 – 20	9	4	5
21 – 30	2	1	1
31 – 40	1	1	0
41 – 50	1	1	0
51 – 60	2	1	1
61 – 70	7	2	5
71 – 80	2	1	1
81 – 90	2	1	1
Σ	31	14	17

Herkunft der Patienten

43 Untersuchungsmaterialien stammten von Patienten des Universitätsklinikums Jena und 16 Proben wurden von auswärtigen Instituten eingesendet. Der folgenden Tab. 4 ist die Verteilung der Herkunftsorte in Abhängigkeit der Diagnose zu entnehmen.

Tab. 4 Verteilung der Herkunftsorte der Patienten in Abhängigkeit von der Diagnose

Herkunft der Patienten	Gesamtanzahl der Patienten	Patienten mit Varizellen	Patienten mit Zoster
Universitätsklinikum Jena	43	24	19
Klinikum Erfurt	3	3	0
Universitätsklinikum Halle- Wittenberg	2	0	2
Universitätsklinikum Erlangen	2	0	2
Klinikum Stuttgart	2	0	2
Laborzentrum Ettlingen	2	0	2
Universitätsklinikum Heidelberg	1	0	1
Universitätsklinikum Magdeburg	1	1	0
Universitätsklinikum Ulm	1	0	1
Universitätsklinikum München	1	0	1
Klinikum Suhl	1	0	1
Σ	59	28	31

Grunderkrankungen der Patienten

Bei zwei Patienten mit Varizellen lag eine akute lymphatische Leukämie als Grunderkrankung vor. Bei den restlichen 26 Patienten mit Varizellen war keine Grunderkrankung bekannt. Vier Zoster-Patienten waren knochenmarktransplantiert, und bei weiteren vier lag die Diagnose einer akuten myeloischen Leukämie vor. Außerdem erhielten zwei Patienten mit Zoster eine Stammzelltransplantation, und bei jeweils einem Patienten lag eine akute lymphatische bzw. eine chronische myeloische Leukämie als Grunderkrankung

vor. Des Weiteren hatte ein Zoster-Patient eine Nierentransplantation. Bei den verbleibenden Personen mit einem HZ lagen keine Angaben zu einer Grunderkrankung vor. Tab. 5 liefert einen Überblick über die bekannten Grunderkrankungen der Patienten mit Varizellen bzw. Zoster.

Tab. 5 Grunderkrankungen der Patienten mit Varizellen oder Zoster

Klinische Diagnose	Gesamtzahl der Patienten	Patienten mit Varizellen	Patienten mit Zoster
Knochenmarktransplantation	4	0	4
Akute myeloische Leukämie	4	0	4
Akute lymphatische Leukämie	3	2	1
Stammzelltransplantationen	2	0	2
Chronische myeloische Leukämie	1	0	1
Nierentransplantation	1	0	1
Σ	15	2	13

4.2 DNA-Patientenproben

Bei acht VZV-Stämmen diente das Patientenmaterial zur Untersuchung, wobei es sich in allen Fällen um Bläscheninhalt handelte. Von den Herkunftsinstituten war die DNA bereits aus dem Patientenmaterial isoliert wurden. Da eine Anzucht dieser Virusstämmen nicht möglich bzw. erfolgreich war, konnte nur die genotypische Resistenzbestimmung durchgeführt werden. Bei allen acht VZV-Stämmen lag eine klinische Resistenz gegen ACV vor. Der Genotyp, welcher nach der Scattered-Single-Nukleotid-Polymorphism-Methode mittels Sequenzierung der ORF 21 und 22 ermittelt worden war (Sauerbrei et al. 2011, Loparev et al. 2007), war bei allen Virusstämmen bekannt. Die Einteilung der Genotypen erfolgte nach Breuer et al. (2010). Zwei VZV-Stämme waren dem Genotyp 3 zugehörig und die verbleibenden sechs den europäischen Genotypen 1 oder 3. Tab. 6 fasst die beschriebenen Materialien mit den dazugehörigen Labornummern zusammen.

Tab. 6 Genotyp der VZV-Stämme, die nur als DNA vorlagen

Lfd. Nr.	Labornummer	Genotyp
1	0154/05	1/3
2	0757/08	1/3
3	0679/09	1/3
4	0940/09	1/3
5	1049/09	1/3
6	2707/09	1/3
7	2817/09	3
8	0152/10	3

4.3 Varicella-Zoster-Virus-Isolate

Bei 51 VZV-Stämmen diente ein Isolat als Untersuchungsmaterial, so dass mit ihnen die phäno- und genotypische Resistenzbestimmung durchgeführt werden konnte. 50 Virusstämme wurden aus Bläscheninhalt isoliert und von einem Patienten (2308/03) stand Pharynxgewebe als Untersuchungsmaterial zur Verfügung. Zwei VZV-Stämme (1704/04, 3532/09) waren klinisch gegen ACV resistent, aber bei den verbleibenden 49 Isolaten war keine antivirale Therapie bekannt. Die VZV-Stämme waren den Hauptgenotypen nach Breuer et al. (2010) zugeordnet. Dem Genotyp 1 waren 18 Isolate zugehörig, und zum Typ 3 zählten 17 Stämme. Der Gruppe des Genotyps 5 konnten 14 Patientenstämme zugeordnet werden. Die Genotypen der Materialien 0457/08 und 1483/05 konnten nicht eindeutig klassifiziert werden, da bei ihnen die Merkmale mehrerer Genotypen festgestellt werden konnten. Für die Verwendung der VZV-Isolate im Rahmen dieser Studie variierte die Anzahl der Zellkulturpassagen zwischen eins und 13. Die für die phäno- und genotypische Resistenztestung genutzten Viruspassagen sind der folgenden Tab. 7 zu entnehmen.

Tab. 7 Genotyp und verwendete Zellkulturpassagen der Varicella-Zoster-Virus-Isolate

Lfd. Nr.	Labornummer	Genotyp	Passage für phänotyp. Resistenztestung	Passage für genotyp. Resistenztestung
1	0413/00	5	6.	2.
2	0417/03	1	13.	5.
3	1328/03	1	8.	6.
4	2308/03	3	13.	7.
5	2342/03	1	8.	6.
6	0204/04	1	9.	6.
7	0235/04	1	11.	6.
8	0281/04	3	7.	5.
9	0329/04	3	5.	3.
10	0875/04	5	3.	1.
11	1243/04	5	6.	5.
12	1251/04	5	6.	5.
13	1256/04	1	8.	3.
14	1499/04	3	9.	4.
15	1533/04	3	10.	4.
16	1704/04	1	4.	1.
17	1762/04	3	7.	6.
18	2098/04	3	6.	4.
19	2205/04	1	5.	4.
20	0003/05	3	7.	6.
21	0134/05	5	12.	3.
22	0168/05	1	4.	3.
23	0189/05	5	5.	4.
24	0217/05	5	13.	5.
25	0218/05	1	5.	4.
26	0248/05	1	9.	4.
27	0492/05	1	4.	3.
28	0528/05	1	6.	3.
29	0551/05	1	9.	3.
30	0847/05	3	3.	2.
31	1015/05	1	9.	4.
32	1078/05	3	9.	4.
33	1211/05	3	10.	4.
34	1483/05	n.k.	8.	2.
35	1621/05	1	4.	2.
36	0482/06	1	12.	3.
37	0784/06	1	4.	3.
38	0927/06	3	8.	3.
39	1078/06	3	6.	5.
40	1571/06	3	7.	2.
41	0052/07	3	11.	2.
42	0445/07	5	6.	3.
43	0446/07	5	8.	3.
44	1219/07	3	5.	3.
45	1805/07	5	8.	2.
46	0457/08	n.k.	5.	3.
47	1279/08	5	9.	3.
48	1330/08	5	7.	3.
49	1637/08	5	7.	3.
50	2926/08	5	10.	3.
51	3532/09	3	4.	2.

n.k. = nicht klassifiziert

4.4 Varicella-Zoster-Virus-Referenzstämme

Als Kontrollstamm für die phänotypischen Resistenzbestimmungen diente der VZV-Impfstamm *vOka* (1002/08) des Genotyps 2. Dieser wurde aus dem Impfstoff Varilrix® (GlaxoSmithKline, Uxbridge, Großbritannien) gewonnen. Des Weiteren wurde der parentale VZV-Stamm *pOka* (1003/08) des Genotyps 2 phäno- und genotypisch getestet. Er stammte ursprünglich von einem japanischen Patienten mit Varizellen und konnte ebenfalls zur Kontrolle herangezogen werden. Für die Phänotypisierung wurde die sechste Zellkulturpassage verwendet und die DNA wurde aus der ersten isoliert. Beide Referenzstämme sind sensitiv gegenüber ACV, PCV, BVDU, CDV und TPF.

Für den Sequenzvergleich des TK- und des DNA-Pol-Gens im Rahmen der genotypischen Resistenzbestimmung wurde der Humane Herpesvirus 3 Stamm *Dumas* des Genotyps 1 verwendet, dessen Sequenz der Genbank entnommen werden konnte. Darüber hinaus wurden Referenzstämme der verschiedenen VZV-Hauptgenotypen 2 bis 5 aus der Genbank einbezogen. Die entsprechenden Accessionsnummern und erfassten Genbereiche sind in Tab. 8 dargestellt.

Tab. 8 Der Genbank entnommene Referenzstämme der VZV-Genotypen 1 bis 5 mit ihren Accessionsnummern und den Genregionen des Thymidin- und DNA-Polymerasegens

Referenzstamm	Genotyp	Accessionsnummer	Genbereich des TK- Gens	Genbereich des DNA-Pol-Gens
Humanes Herpesvirus 3 Stamm: <i>Dumas</i>	1	X04370	64807 – 65832	47052 – 50636
Humanes Herpesvirus 3 Stamm: <i>pOka</i>	2	AB097933	64668 – 65693	46931 – 50515
Humanes Herpesvirus 3 Stamm: <i>vOka</i>	2	AB097932	64692 – 65717	46955 – 50539
Humanes Herpesvirus 3 Stamm: VZV 11	3	DQ479955	64876 – 65901	47124 – 50708
Humanes Herpesvirus 3 Stamm: VZV 8	4	DQ479960	64997 – 66022	47262 – 50846
Humanes Herpesvirus 3 Stamm: CA 123	5	DQ457052	64678 - 65703	46942 - 50526

4.5 Virostatika

Der folgenden Tab. 9 sind die für die phänotypische Resistenzbestimmung eingesetzten antiviralen Substanzen mit ihrem relativen Molekulargewicht sowie dem Hersteller zu entnehmen.

Tab. 9 Verwendete Antivirale Substanzen mit ihrem relativen Molekulargewicht und ihrem Hersteller

Substanz	Relatives Molekulargewicht	Hersteller
Aciclovir (ACV)	225	GlaxoSmithKline, Uxbridge, Großbritannien
Penciclovir (PCV)	278	GlaxoSmithKline, Uxbridge, Großbritannien
Brivudin (BVDU)	333	Berlin-Chemie AG, Berlin, Deutschland
Tri-Sodium-Phosphonoformat (Foscarnet, TPF)	191,96	AstraZeneca, Wilmslow, Großbritannien
Cidofovir (CDV, Vistide [®])	273	Pharmacia & Upjohn, Luxemburg

4.6 Zellkulturen

Für die Anzucht der VZV-Stämme wurden Zellkulturen mit humanen embryonalen Lungenfibroblasten (HELFL) verwendet. Diese wurden in einem serumhaltigen Medium kultiviert, dessen Zusammensetzung in der Rezeptur Nr. 1 beschrieben ist. Um die Virusisolate zu passagieren, wurden sieben Tage alte HELFL mittels Trypsin-Lösung (Rezeptur Nr. 3) vom Gefäßboden abgelöst und resuspendiert. Danach wurden die Zellen in frisches Medium aufgenommen und in neue Zellkulturflaschen eingesät.

4.7 Phänotypische Resistenzbestimmung

4.7.1 Viruspassagierung

Für die Viruspassagierung wurden 5 ml einer HELFL-Suspension mit einer Zelldichte von 5×10^5 Zellen/ml verwendet. Diese wurden in einer T25-Zellkulturflasche mit 0,5 ml Suspension VZV-infizierter Zellen versetzt. Die Kulturen wurden für sieben bis 14 Tage im Brutschrank bei 36°C und 1% CO₂ inkubiert und täglich auf das Erscheinen eines cpEs untersucht (Abb. 8). Sobald ein cpE von ca. 75% erreicht wurde, konnten die infizierten Zellen mechanisch vom Gefäßboden gelöst und in 2 bis 3 ml des vorher abgegossenen Mediums resuspendiert werden. Zur weiteren Viruspassagierung wurden erneut 0,5 ml dieser Suspension auf neue HELFL-Zellen gegeben. Um das Virus zu konservieren, wurde die Zellsuspension zu je 500 µl in Kryoröhrchen abgefüllt und bei -80°C gelagert.

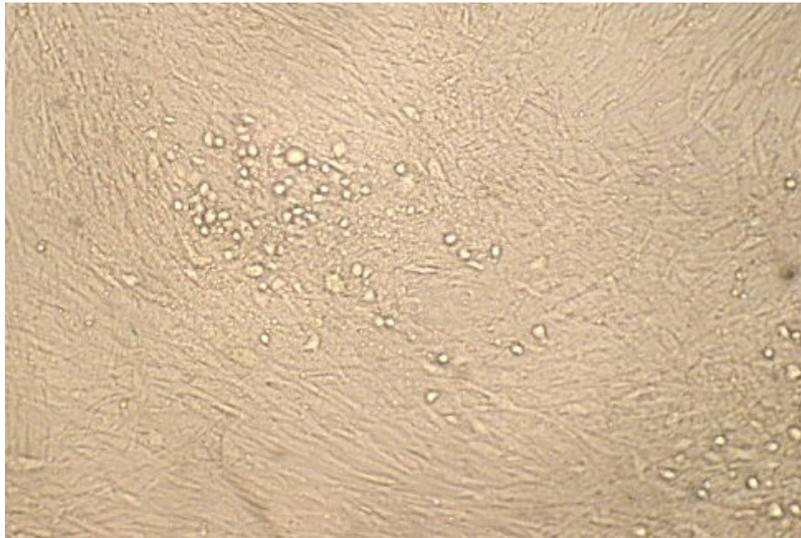


Abb. 8 Infizierte HELF mit typischen VZV-induzierten zytopathischen Effekten
100 x vergrößert

4.7.2 Bestimmung der Viruskonzentration des Referenzstammes

Da der Referenzstamm bei jedem Versuch mitgeführt werden musste, wurde vorher die am besten geeignete Viruskonzentration ermittelt. Dafür wurden in jede Kavität einer 48-Well-Zellkulturplatte 200 μl einer HELF-Suspension mit 2×10^5 Zellen/ml eingesät. Anschließend wurde eine Virusverdünnungsreihe in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM, Rezeptur Nr. 2), beginnend mit 1:2,5 im Sinne einer geometrischen Reihe mit dem Faktor 2 hergestellt. Von jeder Verdünnungsstufe wurden je 100 μl in alle Kavitäten einer Reihe der Platte pipettiert. Danach wurde das Gesamtvolumen jeder Plattenvertiefung mit Medium auf 400 μl aufgefüllt, so dass eine Virusverdünnungsreihe ab 10^{-1} vorlag. Nach einer dreitägigen Inkubation bei 36°C und 1% CO_2 wurden in jeder Kavität die Anzahl der fokalen cpEs gezählt. Als die am besten geeignete Konzentration des *Oka*-Stamms wurde die Verdünnung ausgewählt, bei der die Plaqueanzahl zwischen 20 und 30 lag und alle cpEs gut abgegrenzt erkennbar waren. Dies entsprach einer Viruskonzentration von $10^{3,67}$ TCID₅₀/ml bzw. 0,12 Multiplicity of Infection (MOI). In dieser Konzentration wurde der Referenzstamm für alle Versuche verwendet.

4.7.3 Plaquereduktionstest

Der Plaquereduktionstest diente dazu, alle VZV-Stämme phänotypisch auf Resistenzen gegenüber den beschriebenen Virostatika zu testen. Gegenüber ACV wurden prinzipiell alle VZV-Stämme dieser Studie getestet. Lag eine ACV-Resistenz vor, so wurden auch PCV, BVDU, TPF und CDV in die Untersuchungen einbezogen. Das Ziel war die Ermittlung der IC₅₀ des Virostatikums für jeden einzelnen Virusstamm. Diese Größe ist als die mittlere

inhibitorische Konzentration eines Medikaments definiert, durch die eine 50%ige Hemmung des Virus erreicht wird.

In der Durchführung des Versuchs wurden jeweils 200 µl einer HELF-Suspension mit einer Zellanzahl von 2×10^5 Zellen/ml in die Kavitäten einer 48-Well-Zellkulturplatte eingefüllt. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe des entsprechenden Medikaments, beginnend bei 1:32 im Sinne einer geometrischen Reihe mit dem Faktor 2, in EMEM hergestellt. Die dafür verwendeten Stocklösungen besaßen eine Ausgangskonzentration von 2 mg/ml des jeweiligen Virostatikums. Bei ACV, PCV und CDV lagen die geprüften Konzentrationen zwischen 0,06 µg/ml und 8 µg/ml. Für BVDU reichten die getesteten Konzentrationen von 0,0001 µg/ml bis 8 µg/ml, während TPF in einer Konzentration von 4 µg/ml bis 512 µg/ml geprüft wurde. Der Ansatz der Lösungen erfolgte jeweils in den vierfachen Endkonzentrationen, da die Zellkulturplatten mit je 100 µl Substanz + 100 µl Virus + 200 µl Zellsuspension bestückt wurden (Abb. 9). Die Virusverdünnungen wurden mit EMEM so hergestellt, dass die Endverdünnungen 1:50, 1:100, 1:200 und 1:400 betragen. Die Verteilung der Virusverdünnungen im Teilansatz sowie der Viruskontrollen ist der Abb. 9 zu entnehmen. Damit das Gesamtvolumen ebenfalls 400 µl betrug, erhielten die Kavitäten der Viruskontrollen zusätzlich 100 µl EMEM und die Kavitäten der Zellkontrollen 200 µl EMEM.

Substanz (ACV) in µg/ml		8	4	2	1	0,5	0,25	0,12	0,06
Virusverdünnungen	1:50								
	1:100								
	1:200								
	1:400								
Viruskontrollen (Verdünnungen)		1:50	1:50	1:100	1:100	1:200	1:200	1:400	1:400
Zellkontrollen (ZK)		ZK	ZK	ZK	ZK	ZK	ZK	ZK	ZK

Abb. 9 Aufteilung der 48-Well-Zellkulturplatte beim Plaquereduktionstest am Beispiel eines Aciclovir-Resistenztests

In jeder Versuchsreihe wurde als sensitive Kontrolle der Referenzstamm VZV-*vOka* mitgeführt (s. 4.7.2). Die bestückten Zellkulturplatten wurden für drei Tage im Brutschrank bei 36°C und 1% CO₂ inkubiert. Danach waren in der Regel die entstandenen Plaques gut sichtbar.

4.7.4 Färbung mit Kristallviolett

Nach Ablauf der Inkubationszeit schloss sich eine Färbung der 48-Well-Platten mit 0,3% Kristallviolett (KV) in 3% Formalin (Rezeptur Nr. 4) für 1 h an. Dafür wurden alle Kavitäten mit 200 µl der KV-Lösung befüllt. Anschließend wurden die Platten unter fließendem Leitungswasser gespült, wobei dieser Waschvorgang mehrmals im Abstand von einigen Stunden wiederholt und das Leitungswasser am Ende durch Aqua dest. ersetzt wurde. Die Kristallviolettfärbung diente sowohl der Zellfixierung als auch der besseren Sichtbarmachung der Plaques (Abb. 10a). Deren Auftreten ist in Abhängigkeit der ACV-Konzentration im Ausschnitt einer gefärbten Zellkulturplatte zu erkennen (Abb. 10b).

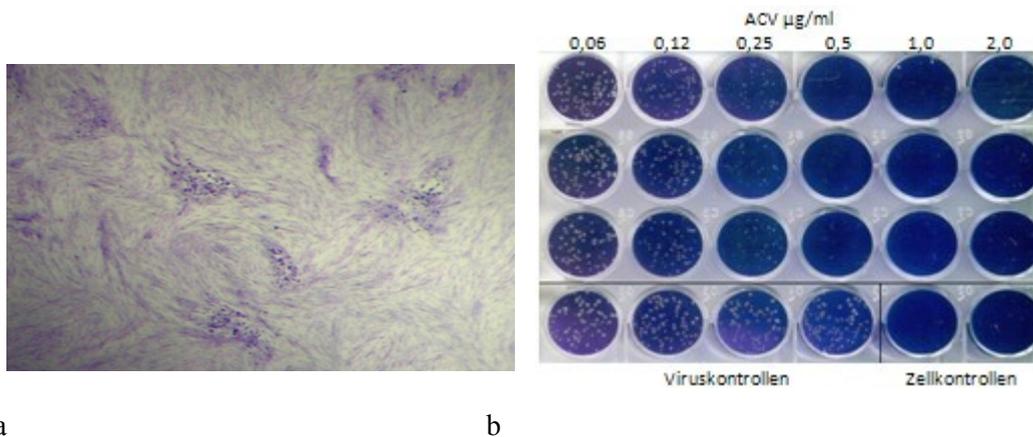


Abb. 10a Ausschnitt einer Kavität mit gefärbten VZV-induzierten Plaques, 25 x vergrößert
10b Ausschnitt einer gefärbten Zellkulturplatte

4.7.5 Auswertung des Plaquereduktionstests

Unter dem Mikroskop wurde bei 25facher Vergrößerung in allen Kavitäten die Anzahl der entstandenen Plaques ermittelt. Aus den Werten aller Wells, die den identischen Inhalt besaßen, wie z.B. die Viruskontrollen der gleichen Verdünnungsstufe, wurde das arithmetische Mittel gebildet. Es schloss sich die Berechnung der prozentualen Substanzaktivitäten jedes einzelnen Wells an, wobei die entsprechende Viruskontrolle als 100%ige Virusaktivität angesehen wurde. Die Berechnungen wurden nach folgenden Formeln vorgenommen:

$$\frac{\text{Plaqueanzahl der Kavität} \times 100\%}{\text{Plaqueanzahl der Viruskontrolle}} = \text{Virusaktivität der Kavität (\%)}$$

$$\text{Substanzaktivität der Kavität (\%)} = 100\% - \text{Virusaktivität der Kavität (\%)}$$

Aus den gewonnenen Daten wurde anschließend für jede Virusverdünnung mittels linearer Regression die Beziehung zwischen der Substanzaktivität als abhängige Variable und der Substanzkonzentration als unabhängige Variable untersucht. Dafür wurde das Statistik-Computerprogramm „Sigmastat Statistical Analysis System“ Version 1.01 genutzt. Da die Substanzkonzentrationen während der Regressionsanalyse in logarithmierter Form vorlagen, war das Ergebnis eine logarithmische Funktion. Diese beschrieb das Verhältnis zwischen den beiden Variablen mit der geringsten Abweichung. Die Funktion hatte beispielsweise folgende Form:

$$\text{Substanzaktivität} = 56,595 + 49,175 \times \log_{10} \text{Substanzkonzentration}$$

Damit unter Verwendung dieser Formel der IC_{50} -Wert einer Virusverdünnung ermittelt werden konnte, wurde an Stelle der Substanzaktivität 50% eingesetzt und die Funktion nach \log_{10} der Substanzkonzentration umgestellt. Durch Potenzierung wurde der Logarithmus umgekehrt und somit der endgültige IC_{50} -Wert in $\mu\text{g/ml}$ ermittelt. Das Ergebnis der oben beschriebenen Beispielfunktion wäre dann $0,7 \mu\text{g/ml}$.

Da das Ergebnis des Referenzstammes *vOka* als Vergleichswert galt, wurde aus allen Virusverdünnungen eines Patientenstamms die Konzentration mit ihrem zugehörigen IC_{50} -Wert ausgewählt, deren Plaqueanzahl sich in der gleichen Größenordnung, wie die des *Oka*-Stamms befand. Lag die Substanzkonzentration der 50%igen Hemmung eines Patientenstamms über dem Vierfachen der IC_{50} des sensitiven Referenzstamms, wurde dieser VZV-Stamm als resistent angesehen.

4.8 Genotypische Resistenzbestimmung

4.8.1 DNA-Isolierung

Für die genotypische Resistenzbestimmung musste aus 53 Virusisolaten die VZV-DNA isoliert werden. Dafür wurde der QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit verwendet und die Arbeitsschritte folgten dem vom Hersteller empfohlenen „Blood and Body Fluid Spin Protocol“. Zuerst wurden als Lyseansatz 20 μl Qiagen-Protease, 200 μl virushaltiges Material und 200 μl AL-Lysispuffer in ein 1,5 ml-Safelock-Eppendorf-Röhrchen pipettiert. Dieses wurde danach gut verschlossen und der Inhalt mit einem Vortexer gemischt. Anschließend erfolgte eine Wärmebehandlung für 10 min bei 56°C in einem Thermomixer, wodurch es zur Spaltung bzw. Auflösung der Zellwände kam und die DNA freigesetzt wurde. Mit der Zugabe

von 200 µl 100%igem Ethanol wurde die Lyse beendet. Im Anschluss daran wurde die Probe in eine QIAamp-Spinsäule, welche sich auf einem 2 ml-Collection-Tube befand, übertragen und bei 6.000 x g für 1 min zentrifugiert. Die abzentrifugierte Flüssigkeit wurde verworfen und die Spinsäule auf ein neues 2 ml-Röhrchen gestellt. Die DNA befand sich nun gebunden an der QIAamp-Silicagelmembran in der Spinsäule. Damit die DNA vollständig gereinigt und von Kontaminaten befreit wurde, erfolgte das Waschen mit zwei verschiedenen Waschpuffern. Nacheinander wurden jeweils 500 µl des Puffers AW1 und AW2 auf die Säule pipettiert und diese 1 min bei 6.000 x g zentrifugiert. Zwischen den zwei Schritten wurden die Auffanggefäße gewechselt. Eine weitere Zentrifugation von 5 min bei 16.000 x g war erforderlich, um die DNA vom restlichen Puffer zu befreien. Anschließend wurde die QIAamp-Spinsäule auf ein neues 1,5 ml-Eppendorf-Röhrchen gestellt und die Membran mit 50 µl Elutionspuffer (AE) behandelt. Damit die DNA komplett aus der Säule gelöst werden konnte, musste zunächst eine Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur erfolgen. Mit einem letzten zweiminütigen Zentrifugationsschritt bei 6.000 x g wurde die DNA in dem Eppendorf-Röhrchen aufgefangen und war damit vollständig isoliert. Die auf diese Weise erhaltenen Eluate konnten in einem Gefrierschrank bei -20°C über einen längeren Zeitraum gelagert werden.

4.8.2 DNA-Amplifikation

Um sowohl das TK-Gen (ORF 36) als auch das DNA-Pol-Gen (ORF 28) zu amplifizieren, wurde die PCR genutzt. Da die beiden Gene jedoch zu groß waren, um sie in einem Fragment zu amplifizieren, mussten sie in kleinere Teilabschnitte gegliedert werden. Dafür wurde das TK-Gen (1026 bp) in zwei Teile und das DNA-Pol-Gen (3585 bp) in vier Abschnitte zerlegt. Die dafür verwendeten Primer sind in den Tab. 10 und 11 beschrieben und die Größen der entstehenden Fragmente in Tab. 14 einzusehen.

Das Prinzip der PCR basiert auf der zyklischen Abfolge von Denaturierungs-, Annealing- und Elongationsvorgängen. Durch das mehrfache Wiederholen dieser Reaktionen ist es möglich, einen bestimmten Abschnitt der DNA stark zu vervielfältigen.

Tab. 10 Primer für die Herstellung der Thymidinkinasegen-Fragmente

Fragment	Primer-orientierung	Name des Primers	Nukleotidsequenz 5' → 3'	Nukleotide des VZV-Genoms
A	vorwärts	VZV-TK1	GGT CAC CAT TAT TTC ATC AGA TC	64322 - 4344
	rückwärts	VZV-TK2R	CTC CCA CTA AGT ATC TGG ACA AG	65248 - 65226
B	vorwärts	VZV-TK3	CCT GAA GAC GCA CAA CGC CTC AC	65041 - 65063
	rückwärts	VZV-TK4	GAA AAA CAC GTA CAC GCG AGT ATG	65905 - 65882

Tab. 11 Primer für die Herstellung der DNA-Polymerasegen-Fragmente

Fragment	Primerorientierung	Name des Primers	Nukleotidsequenz 5' → 3'	Nukleotide des VZV-Genoms
A	vorwärts	VZV-Pol1	CAA ACA GAG ACT GTG GTG CCA TC	46991 - 47013
	rückwärts	VZV-Pol1R	GTT TTG TCC TCC TAT AAA GTT GG	47991 - 47969
B	vorwärts	VZV-Pol3+	CAT TCA GCA ATG GAA ACA CAC G	47749 - 47770
	rückwärts	VZV-Pol2	CTA GTG GAC CGA ATA CAC GAG G	49000 - 48979
C	vorwärts	VZV-Pol5+	CGG ATG GAT TCA AAC GTT TAA CC	48494 - 48516
	rückwärts	VZV-Pol3R	CTA CGA TAC ACA GCC ATG TGC G	49914 - 49893
D	vorwärts	VZV-Pol9	CAT CGT TTG GTA TAG CCT GCA G	49625 - 49646
	rückwärts	VZV-Pol4	GCG GAA ACC ACA ACA AAT CAC GTG	50745 - 50722

Amplifikation des Thymidinkinasegens

Für die Amplifikation des TK-Gens wurde der Taq Core Kit 10 verwendet. Der PCR-Ansatz erfolgte stets auf Eis, um die Qualität aller Bestandteile zu gewährleisten. Der 50 µl Mastermix setzte sich wie folgt aus den vom Hersteller mitgelieferten Komponenten sowie den Primern zusammen:

- 5 µl 10x PCR-Puffer mit MgCl₂
- 1 µl 10 mM dNTP-Mix
- 2 µl 10 µM Vorwärts-Primer
- 2 µl 10 µM Rückwärts-Primer
- 0,5 µl Taq-DNA-Polymerase
- 34,5 µl DEPC-Wasser (Rezeptur Nr. 5)
- 5 µl Template DNA

Der PCR-Verlauf ist mit seinen verschiedenen Schritten und den dazugehörigen Temperaturen in Tab. 12 dargestellt.

Tab. 12 Verlauf der PCR für die Amplifikation des Thymidinkinasegens

Vorgang	Zyklusanzahl	Temperatur	Dauer
Startdenaturierung	1	94°C	5 min
Denaturierung	38	94°C	50 s
Annealing		55°C	50 s
Elongation		72°C	90 s
Endelongation	1	72°C	5 min
Abkühlung	1	4°C	bis zur Probenentnahme

Amplifikation des DNA-Polymerasegens

Da die Fragmente des DNA-Pol-Gens größer waren, wurde für diese PCR der High Fidelity PCR Enzyme Mix genutzt. Die Besonderheit dieses Mix liegt darin, dass er zusätzlich zur Taq-DNA-Polymerase eine thermostabile Pfu DNA-Polymerase enthält. Diese besitzt eine sogenannte „proofreading“-Aktivität und macht es dadurch möglich, lange PCR-Produkte mit großer Genauigkeit herzustellen. Auch hier erfolgte der PCR-Ansatz auf Eis.

Im Folgenden wird die Zusammensetzung eines Mastermixes für eine 50 µl PCR-Probe dargestellt:

- 5 µl 10 x High Fidelity PCR Buffer mit 15 mM MgCl₂
- 5 µl 2 mM dNTP-Mix
- 2 µl Vorwärts-Primer
- 2 µl Rückwärts-Primer
- 0,25 µl High Fidelity PCR Enzyme Mix
- 34,75 µl DEPC-Wasser
- 1 µl Template DNA

Da die dNTPs nicht im Kit enthalten waren, wurden die der Firma MP Biomedicals genutzt und vorher von 10 mM auf die benötigte Konzentration von 2 mM verdünnt. Der Ablauf des PCR-Programms ist in Tab. 13 dargestellt.

Tab. 13 Verlauf der PCR für die Amplifikation des DNA-Polymerasegens

Vorgang	Zyklusanzahl	Temperatur	Dauer
Startdenaturierung	1	95°C	3 min
Denaturierung	10	95°C	40 s
Annealing		55°C	15 s
Elongation		68°C	7 min
Denaturierung	25	95°C	40 s
Annealing		55°C	45 s
Elongation		68°C	7 min
Endelongation	1	68°C	10 min
Abkühlung	1	4°C	bis zur Probenentnahme

Nachdem alle Bestandteile im PCR-Ansatz vereinigt waren, wurde dieser gut gevortext und kurz zentrifugiert. Anschließend konnte die PCR in einem T3-Thermozykler bzw. Trio-Thermoblock 1993 ablaufen. Die fertigen Amplifikate wurden danach entweder über Nacht bei 4°C im Kühlschrank oder für einen längeren Zeitraum bei -20°C im Gefrierschrank aufbewahrt.

Primersynthese

Die Synthese der verwendeten Primer erfolgte direkt im Institut für Virologie und Antivirale Therapie. Für die Herstellung der DNA-Primer diente der Expedite™ DNA/RNA Synthesizer, Modell 8909 (Applied Biosystems, Framingham, USA; Software-Version 2.4). Das System arbeitet nach der Festphasen-Phosphoramidit-Methode. Spezielle Säulen (Proligo Biochemie GmbH, Hamburg) mit entsprechenden Startnucleosiden dienten bei der Primersynthese als Festphasenträger. Die Säulen wurden anschließend mit 28%igem Ammoniak behandelt und für 20 bis 24 h bei 55°C inkubiert. Dadurch wurden die Abspaltung von dem Festphasenträger und die Entschützung des Primers ermöglicht. Die Aufreinigung der Oligonucleotide erfolgte mit Hilfe der Shimadzu HPLC LC 10AT Flüssigkeitschromatographie unter der Verwendung einer Mono Q 5/5 Anionenaustauschsäule (Pharmacia, Uppsala, Schweden). Zur anschließenden Entsalzung diente Sephadex G25 (Pharmacia, Uppsala, Schweden). Das erhaltene Primer-Lyophilisat wurde in DEPC-Wasser resuspendiert und danach auf die Gebrauchskonzentration von 10 µM verdünnt.

4.8.3 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese diente der Darstellung und Größenüberprüfung der hergestellten Amplifikate und erfolgte in einer Elektrophoresekammer. Aufgrund der zu erwartenden Größe der Amplifikate wurde ein 1%iges Gel gegossen, wobei die Agarose (GTQ, Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe) in 1x TBE (Tris-Borat-EDTA)-Puffer (Rezeptur Nr. 8) gelöst und anschließend in einem Mikrowellengerät aufgeköcht wurde. Zum späteren Sichtbarmachen der DNA unter UV-Licht wurden nach kurzer Abkühlung des Gels 7 µl Ethidiumbromid zugegeben. Jetzt konnte das Gelbett mit Hilfe des Gel-Gieß-Kits gegossen werden. Ein Teflonkamm mit 12 Zähnen, welcher in das noch flüssige Gel gehängt wurde, diente dem Formieren der Geltaschen. Im Anschluss an die Verfestigung des Gels konnte der Teflonkamm entfernt und das Gel in eine mit 1 x TBE-Puffer gefüllten Gelelektrophoresekammer umgelagert werden. Bevor 10 µl der zu analysierenden Proben in die Taschen pipettiert werden konnten, wurden sie in folgender Zusammensetzung zubereitet:

- 5 µl Ladepuffer (Rezeptur Nr. 9)
- 5 µl TE-Puffer (Rezeptur Nr. 10)
- 2 µl PCR-Produkt.

Zur vergleichenden Größenbestimmung der Fragmente diente der DNA-Molekulargewichtstandart Marker XIV (Roche Applied Science, Mannheim) in einer Konzentration von 250 µg/ml. Vor dem Gebrauch wurden 5 µl Marker mit 5 µl TE-Puffer

und 10 µl Ladepuffer verdünnt. Davon wurden bei jeder Gelelektrophorese 6 µl in eine Geltasche pipettiert. Bei einer eingestellten Spannung von 80 V Gleichstrom am Stromversorgungsgerät war eine Laufzeit von 60 min ausreichend. Danach wurden die DNA-Banden mittels UV-Licht in einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und konnten anhand eines ausgedruckten Bildes ausgewertet werden. Die Abb. 11 gibt als Beispiel zwei solche Fotos wieder und der Tab. 14 sind die zu erwartenden Größen der einzelnen Fragmente zu entnehmen.

Tab. 14 Größe der amplifizierten Genfragmente

Fragment	Fragmentgröße (in bp)
TK-Gen	
Teilfragment A	926
Teilfragment B	864
DNA-Pol-Gen	
Teilfragment A	1000
Teilfragment B	1251
Teilfragment C	1420
Teilfragment D	1120

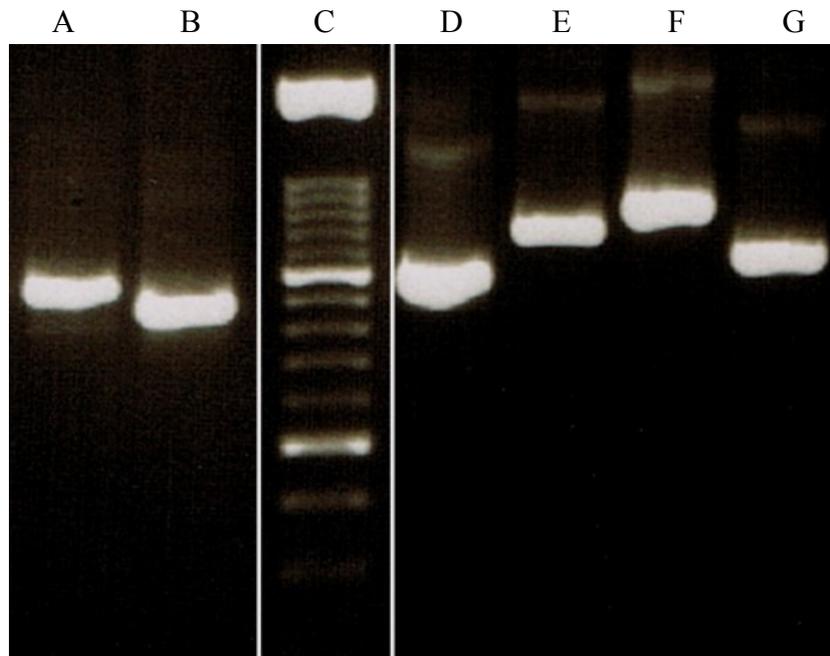


Abb. 11 Gelelektrophoresebilder nach Amplifikation der DNA-Fragmente am Beispiel des Isolats 0413/00

- | | |
|---|-------------------------------|
| A) TK-Gen Teilfragment A | D) DNA-Pol-Gen Teilfragment A |
| B) TK-Gen Teilfragment B | E) DNA-Pol-Gen Teilfragment B |
| C) DNA-Molekulargewichtstandart
Marker XIV | F) DNA-Pol-Gen Teilfragment C |
| | G) DNA-Pol-Gen Teilfragment D |

4.8.4 Aufreinigung der amplifizierten DNA-Fragmente

Die Aufreinigung der hergestellten Amplifikate erfolgte mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit und wurde nach dem vom Hersteller angegebenen Protokoll durchgeführt. Dafür wurde zuerst zu einem Volumen PCR-Produkt (50 µl) das fünffache Volumen eines Bindungspuffers PBI (250 µl) zugegeben und mit dem Vortexer gut gemischt. Danach wurde die gesamte Probe in eine QIAquick-Spinsäule überführt und diese für 1 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Dabei wurde die DNA an die sich in der Säule befindende Membran gebunden. Nachdem der Durchfluss verworfen worden war, konnte die Spinsäule wieder auf dem gleichen Collection-Tube platziert werden. Um die DNA-Probe von allen überflüssigen Bestandteilen zu reinigen, wurden 750 µl PE-Puffer in die Säule pipettiert und eine Inkubationszeit von 5 min abgewartet. Darauf folgten zwei Schritte, wobei zuerst für eine und anschließend für 2 min bei 16.000 x g zentrifugiert wurde, so dass die DNA getrocknet und der Puffer restlos entfernt wurde. Zwischendurch wurde der restliche Durchfluss verworfen. Zuletzt wurde die QIAquick-Spinsäule auf ein neues 1,5 ml- Eppendorf-Röhrchen gesetzt und 30 bis 50 µl des Elutionspuffers (EB) auf die Membran gegeben. Die verwendete Menge EB-Puffer variierte dabei abhängig von der Bandenstärke im Gel. Sollte diese sehr ausgeprägt gewesen sein, konnten 50 µl verwendet werden, bei schwachen Banden allerdings nur 30 µl Puffer. Bei geringen verwendeten Mengen wurde die Probe erneut für 1 min inkubiert. Durch eine letzte Zentrifugation für 1 min bei 16.000 x g konnte das aufgereinigte DNA-Produkt aufgefangen und anschließend für mehrere Wochen bei -20°C aufbewahrt werden. Der DNA-Gehalt der Amplifikate wurde mit einem Nano Drop Spektrophotometer gemessen, damit anhand der Konzentration die Amplifikatmenge bestimmt werden konnte, die für die sich anschließende Sequenzier-PCR nötig war.

4.8.5 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung basiert auf der Kettenabbruchmethode nach Sanger. Diese wurde von Sears et al. (1992) und Slatko (1996) modifiziert und als Cycle-Sequencing benannt. Bei der Kettenabbruchmethode werden vier Arten fluoreszenzmarkierter Didesoxyribonukleosid-Triphosphate (ddNTP) verwendet, die jeweils mit einem von vier verschiedenen Farbstoffen verknüpft sind. Da diese keine 3'-OH-Gruppen besitzen, kommt es nach ihrem Einbau in die DNA zum Kettenabbruch. Durch die zufällige Integration dieser ddNTPs entstehen DNA-Stränge jeder Länge. Werden die gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe von einem Laser angeregt, leuchten sie in ihren verschiedenen Farben und können dadurch detektiert werden. Dazu werden sie in einer Kapillare des Sequenziergerätes der Größe nach elektrophoretisch

aufgetrennt und mittels Fluoreszenzspektroskopie aufgezeigt. Die Sequenzierung wurde in dem ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer durchgeführt. Die Sequenzanalyse der VZV-Stämme 0154/05, 1483/05, 0457/08, 1002/08, 1003/08, 0940/09, 1049/09, 2707/09, 2817/09 und 0152/10 erfolgte mit dem CEQ™ 8000 Genetic Analysis Systeme.

Zur Vorbereitung der Amplifikate auf die Sequenzierung mittels des ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer wurde der DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit verwendet. Die Zusammensetzung des Sequenzieransatzes erfolgte wie vom Hersteller angegeben:

- 2 bis 7 µl aufgereinigtes PCR-Produkt (ca. 100 ng/µl)
- 2 µl Sequenzier-Reaktionsmix (inkl. DNA-Polymerase und ddNTPs)
- 0,5 µl Primer
- DEPC-Wasser ad 10 µl

Das Ansetzen der Sequenzier-PCR für das CEQ™ 8000 Genetic Analysis Systeme erforderte die Verwendung des GenomeLab™ DTCS Quick Start Kit. Der Ansatz erfolgte nach den Herstellerangaben und setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

- 2 bis 6 µl aufgereinigtes PCR-Produkt
- 4 µl Sequenzier-Mix
- 0,5 µl Primer
- 1 µl DMSO (Dimethylsulfoxid)
- DEPC-Wasser ad 10 µl

Sequenzierung des Thymidinkinasegens

In der Tab. 15 sind die Primer aufgelistet, die für die Sequenzierung des TK-Gens verwendet wurden. Des Weiteren ist ihre Position und Leserichtung in der Abb. 12 dargestellt. Die Primerauswahl erfolgte unter dem Gesichtspunkt, dass mit einem Primer ca. 500 bp sequenziert werden konnten und eine Überlappung von ungefähr 50 bp zwischen den Teilsequenzen entstehen sollte.

Tab. 15 Primer für die Sequenzierung des Thymidinkinasegens

Fragment	Primerorientierung	Name des Primers	Nukleotidsequenz 5' → 3'	Nukleotide des VZV-Genoms
A	rückwärts	VZV-TK2R	CTC CCA CTA AGT ATC TGG ACA AG	65248 - 65226
B	vorwärts	VZV-TK3	CCT GAA GAC GCA CAA CGC CTC AC	65041 - 65063
	rückwärts	VZV-TK4	GAA AAA CAC GTA CAC GCG AGT ATG	65905 - 65882

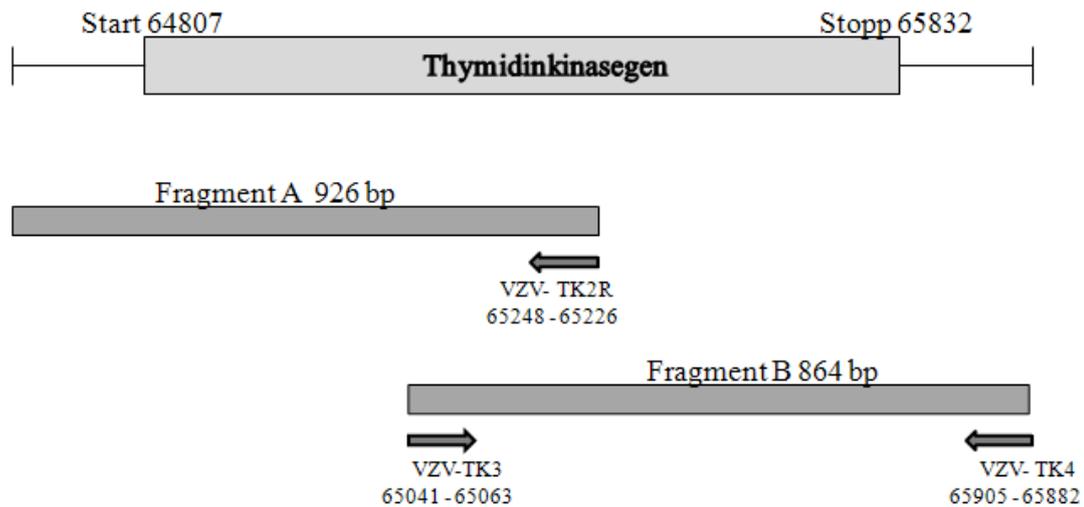
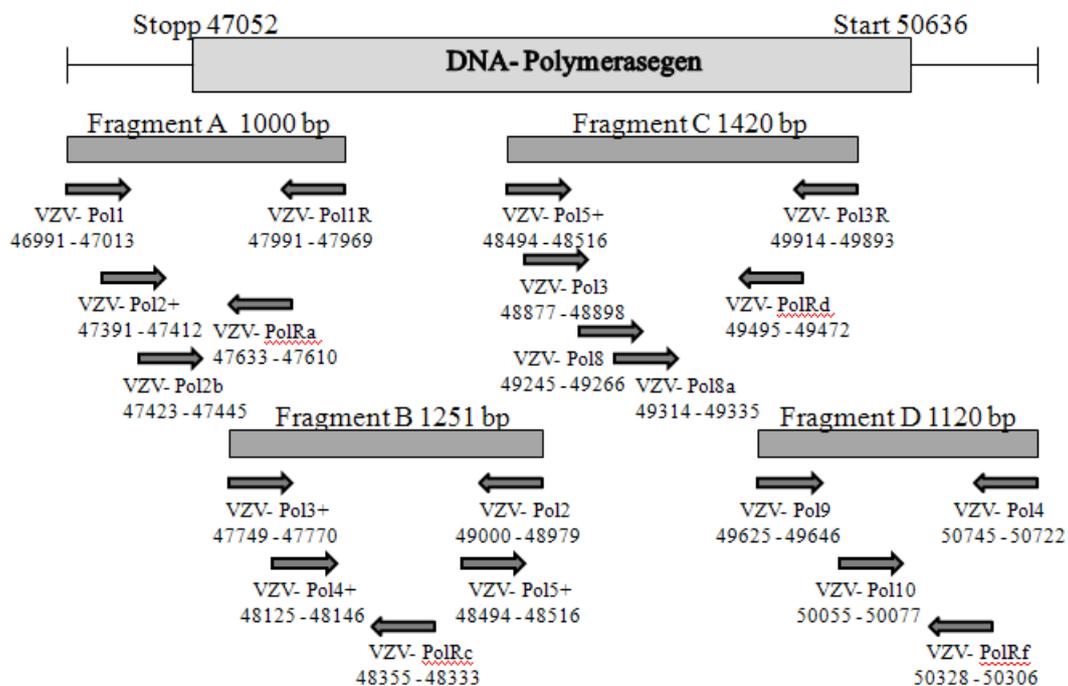


Abb. 12 Darstellung der Primer zur Sequenzierung des Thymidinkinasegens

Sequenzierung des DNA-Polymerasegens

Die für die Sequenzierung des DNA-Pol-Gens verwendeten Primer sind der Tab. 16 zu entnehmen. Ihre Position und Leserichtung sind in der Abb. 13 dargestellt. Für gewöhnlich mussten zur Sequenzierung des DNA-Pol-Gens nicht alle aufgelisteten Primer verwendet werden, sondern nur die folgenden: VZV-Pol 1, 2+, 3+, 4+, 5+, 3, 8, 9, 10 und 4. In seltenen Fällen wurde jedoch keine ausreichende Überlappung erreicht, so dass auftretende Sequenz-Lücken mit den zusätzlichen Primern geschlossen werden konnten.



Tab. 16 Primer für die Sequenzierung des DNA-Polymerasegens

Fragment	Primerorientierung	Name des Primers	Nukleotidsequenz 5' → 3'	Nukleotide des VZV-Genoms
A	vorwärts	VZV-Pol1	CAA ACA GAG ACT GTG GTG CCA TC	46991 - 47013
	vorwärts	VZV-Pol2+	GTC AGA TAT TAT TAA CTT ACG C	47391 - 47412
	vorwärts	VZV-Pol2b	CAC ACC GTT TAC CTG CGG TAT TC	47423 - 47445
	rückwärts	VZV-PolRa	CTT AGT CGT CCA CCA TCC GCC TAC	47633 - 47610
	rückwärts	VZV-Pol1R	GTT TTG TCC TCC TAT AAA GTT GG	47991 - 47969
B	vorwärts	VZV-Pol3+	CAT TCA GCA ATG GAA ACA CAC G	47749 - 47770
	vorwärts	VZV-Pol4+	GAA CGC TAC TTT CAA TGT CTG G	48125 - 48146
	rückwärts	VZV -PolRc	CAG ATG AAG CAG TGT TAT TAG AC	48355 - 48333
	vorwärts	VZV-Pol5+	CGG ATG GAT TCA AAC GTT TAA CC	48494 - 48516
	rückwärts	VZV-Pol2	CTA GTG GAC CGA ATA CAC GAG G	49000 - 48979
C	vorwärts	VZV-Pol3	CTA GCT AGC CTT GCA ACC GCG G	48877 - 48898
	vorwärts	VZV-Pol8	GTA TAT AGA ATT AAG TTT CTC C	49245 - 49266
	vorwärts	VZV-Pol8a	CTC GGG AGC GTA CTG TTT TAC G	49314 - 49335
	rückwärts	VZV -PolRd	CAA TCC CTC GAC AGT CTT TAG AAC	49495 - 49472
	rückwärts	VZV-Pol3R	CTA CGA TAC ACA GCC ATG TGC G	49914 - 49893
D	vorwärts	VZV-Pol9	CAT CGT TTG GTA TAG CCT GCA G	49625 - 49646
	vorwärts	VZV-Pol10	GGC AAG TAA TAC AGA TAA CTC GC	50055 - 50077
	rückwärts	VZV-PolRf	CTT TCG TGG GGA TAT GTT TGA CC	50328 - 50306
	rückwärts	VZV-Pol4	GCG GAA ACC ACA ACA AAT CAC GTG	50745 - 50722

Die zeitlichen Abläufe der verwendeten Sequenzier-PCR-Programme sind mit ihren dazugehörigen Temperaturen in Tab. 17 und 18 dargestellt.

Tab. 17 Ablauf der Sequenzier-PCR für den ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer

Vorgang	Zyklusanzahl	Temperatur	Dauer
Startdenaturierung	1	95 °C	3 min
Denaturierung	25	95 °C	20 s
Annealing		50 °C	15 s
Elongation		60 °C	1 min
Endelongation	1	60 °C	10 min
Abkühlung	1	4 °C	bis zur Probenentnahme

Tab. 18 Ablauf der Sequenzier-PCR für das CEQ™ 8000 Genetic Analysis Systeme

Vorgang	Zyklusanzahl	Temperatur	Dauer
Startdenaturierung	1	95 °C	1 min
Denaturierung	29	95 °C	20 s
Annealing		50 °C	20 s
Elongation		60 °C	3 min
Abkühlung	1	4 °C	bis zur Probenentnahme

Um anschließend die DNA für die Sequenzierung im ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer von allen überflüssigen Bestandteilen zu reinigen, musste eine Ethanol-fällung durchgeführt werden. Dabei wurden zu jedem PCR-Produkt 10 µl steriles Aqua dest., 2 µl 1,5 M Natriumacetat-EDTA und 80 µl 100%iges Ethanol zugegeben. Nach gründlicher Durchmischung wurde die DNA in einer 25-minütigen Zentrifugation bei 16.000 x g pelletiert und der Überstand abpipettiert. Darauf folgend wurde das Pellet mit 200 µl 80%igem Ethanol gewaschen und für 15 min erneut bei 16.000 x g zentrifugiert. Nach dem Abheben des Überstandes schloss sich eine letzte Zentrifugation für 5 min bei gleicher Drehzahl an. Nachdem das restliche Ethanol entfernt war, wurden die Proben unter Vakuumbedingungen bei 30°C für 10 min getrocknet. Die PCR-Produkte für das CEQ™ 8000 Genetic Analysis Systeme wurden ebenfalls mittels einer Ethanol-fällung aufgereinigt. Dafür wurden zu jeder Probe 60 µl absoluter Ethanol und eine Fällungslösung mit folgenden Bestandteilen zugefügt:

- 2 µl Natrium-Acetat pH 5,2
- 2 µl 100 mM EDTA pH 8
- 1 µl Glykogen

Der weitere Verlauf dieser Fällung erfolgte wie bereits oben beschrieben und unterschied sich nur in den Zentrifugationszeiten, die nun 15, 5 und 2 min betragen. Bevor die DNA sequenziert werden konnte, wurde das Pellet in 30 µl SLS (Sample Loading Solution, Beckman Coulter) gelöst und 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend konnte die Genanalyse im CEQ™ 8000 Genetic Analysis Systeme durchgeführt werden. Damit es möglich wurde, die Proben im ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer zu sequenzieren, mussten die Pellets in 20 µl 50%igem Formamid gelöst werden. Das 100%ige Formamid wurde vorher für 30 min mit dem Ionenaustauscher AG 501-X8 unter ständigem Rühren bei Zimmertemperatur deionisiert (1g Ionenaustauscher auf 10 ml Formamid).

4.8.6 Analyse der Sequenzdaten

Die vom ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer und CEQ™ 8000 Genetic Analysis Systeme gelieferten Daten wurden mit dem Computerprogramm MEGA 4.1 verarbeitet, indem ein Alignment erstellt wurde. Als VZV-Referenzstamm für das TK- und DNA-Pol-Gen diente der Referenzstamm *Dumas* des Genotyps 1, dessen DNA-Sequenz bereits in der Genbank publiziert wurde (s. 4.4, Tab. 8). Alle im Rahmen dieser Arbeit aufgeführten Sequenzen entsprechen den Nukleotidpositionen des *Dumas*-Stammes, der auch für die Analyse von Mutationen als Referenzstamm diente. Somit konnten Veränderungen im Genom der untersuchten VZV-Stämme erkannt und analysiert werden. Die gefundenen Sequenzabweichungen wurden mit bereits publizierten Mutationen bzw. Polymorphismen verglichen. Anhand dieser Daten konnte zum Teil auf eine genotypische Resistenz oder Sensitivität geschlossen werden. Traten unbekannte Mutationen auf, wurde das Ergebnis der phänotypischen Resistenzbestimmung zur Interpretation herangezogen.

4.8.7 Statistische Analyse

Um zu untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen den AS-Substitutionen des DNA-Pol-Gens in ACV-sensitiven VZV-Stämmen und den Genotypen 1, 3 und 5 besteht, wurde der Fisher-Exakt-Test angewendet. Diese statistische Methode ist ein Signifikanztest zur Überprüfung der Unabhängigkeit anhand einer Kontingenztafel und liefert auch dann zuverlässige Ergebnisse, wenn nur eine geringe Anzahl von Beobachtungen vorliegt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit für einen signifikanten Unterschied wurde mit $p < 0,05$ definiert. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms „IBM SPSS Statistics 19“ der Firma SPSS Inc.

4.9 Verwendete Kitsysteme

In der Tab. 19 sind die Kitsysteme aufgeführt, die für die vorliegende Arbeit verwendet wurden.

Tab. 19 Kitsysteme mit Angabe der Hersteller

Name	Hersteller
DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
GenomeLab™ DTCS Quick Start Kit	Beckman Coulter, Krefeld
High Fidelity PCR Enzyme Mix	Fermentas GmbH, St.-Leon-Rot
QIAamp® DNA Blood Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Taq Core Kit 10	MP Biomedicals Europe, Eschwege

4.10 Geräte und technische Hilfsmittel

In der folgenden Tab. 20 sind alle technische Geräte und Hilfsmittel mit ihrem Hersteller aufgelistet, die während der Arbeit im Labor verwendet wurden.

Tab. 20 Geräte und Hilfsmittel mit Angabe der Hersteller

Gerät/ Hilfsmittel	Hersteller
Biofuge pico	Heraeus Instruments, Hanau
Brutschrank, Function line	Heraeus Instruments, Hanau
Combitips plus 5 ml, 10 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Cryo's™	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Elektrophoresekammer HE 33 Mini horizontal submarine unit	Hoefler Inc., Holliston, Massachusetts, USA
Eppendorf-Pipetten für: 0,5 – 10 µl, 2 – 20 µl, 10 – 100 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl, 500 – 2500 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf-Tubes : 0,5 ml (dünnwandig), 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Elektronikrührer Mono	Variomag, H+P Labortechnik GmbH, München
Falcon Röhrchen Cellstar® 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Feinwaage Sartorius	Sartorius AG, Göttingen
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss Werk, Jena
Mixröhrchen 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Multipette® plus	Eppendorf AG, Hamburg
Nano Drop Spektrophotometer ND-1000	peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences, Fernwald
Sequenzierer ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer CEQ™ 8000 Genetic Analysis Systeme	Applied Biosystems GmbH, Darmstadt Beckman Coulter Inc., Fullerton, California, USA
Stromversorgungsgerät Electrophoresis Power Supply – EPS 601	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg
Trio-Thermoblock 1993	Biometra, Göttingen
T3-Thermozykler	Biometra, Göttingen
T25-Zellkulturflasche Nunclon™Δ Surface	Nunc, Roskilde, Dänemark
UV-Transilluminator BioDoc Analyse System	Biometra, Göttingen
Vakuumtrockner Eppendorf concentrator 5301	Eppendorf AG, Hamburg
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Inc, USA
Zählkammer Glasstic® Slide 10 with Grids	Hycor Biomedical GmbH, Kassel
Zellschaber 28 cm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
48-Well-Zellkulturplatte, Cellstar	Greiner Bio- One GmbH, Frickenhausen

4.11 Rezepturen

In der folgenden Tab. 21 sind alle Rezepturen, auf die in dieser Arbeit verwiesen wird, mit ihrer Zusammensetzung beschrieben.

Tab. 21 Zusammensetzung der Rezepturen

Nummer	Name der Rezeptur und Zusammensetzung
1.	Serumhaltiges Medium zur HELF-Kultivierung <ul style="list-style-type: none"> - 500 ml Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) mit 25 mM Hepes-Puffer und mit Earle's Balanced Salt Solution (Lonza, Belgien) - 200 mM L-Glutamin - 10.000 U/ml Penicillin/Streptomycin - 10% fetales Kälberserum (PAA Laboratories GmbH, Österreich)
2.	EMEM <ul style="list-style-type: none"> - 500 ml Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) mit 25 mM Hepes-Puffer und mit Earle's Balanced Salt Solution (Lonza, Belgien) - 200 mM L-Glutamin - 10.000 U/ml Penicillin/Streptomycin
3.	Trypsin-Phosphatpufferlösung (1 l) <ul style="list-style-type: none"> - 8,0 g NaCl - 0,2 g KCl - 2,9 g Na₂HPO₄ x 12 H₂O - 0,2 g KH₂PO₄ - 2,0 ml Phenolrot - 0,5 g Trypsin
4.	0,3% Kristallviolett in 3% Formalin (0,5 l) <ul style="list-style-type: none"> - 42,7 ml 35% Formalin - 100 ml Kristallviolett in 15% Methanol - 447,3 ml Aqua dest.
5.	DEPC-Wasser <ul style="list-style-type: none"> - 2 ml 162,1 M C₆H₁₀O₅ (Diethylpyrocarbonat) - Aqua dest. ad 2000 ml
6.	0,5 M EDTA <ul style="list-style-type: none"> - 18,6 g/80 ml Aqua dest. - NaOH- Plättchen- Zugabe bis pH 8,0 - Aqua dest. ad 100 ml
7.	5x Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE) (1 l, pH 8,3) <ul style="list-style-type: none"> - 54 g Tris - 27,5 g Borsäure - 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) - Aqua dest. ad 1000 ml
8.	1x Tris-Borat-EDTA-Puffer <ul style="list-style-type: none"> - 100 ml 5x TBE-Puffer - 400 ml Aqua dest.
9.	Ladepuffer <ul style="list-style-type: none"> - 50 mg Bromphenolblau - 13,78 ml 87% Glycerin - 28 ml 10 mM EDTA-Lösung (pH 8,0)
10.	Tris-HCl-EDTA-Puffer (TE) (1 l) <ul style="list-style-type: none"> - 10 ml 1M Tris HCl (pH 8,0) - 2 ml 0,5 M EDTA - Aqua dest. ad 1000 ml
11.	10 mM EDTA (pH 8,0) <ul style="list-style-type: none"> - 0,372 g EDTA - 100 ml Aqua dest. - 1 N NaOH- Lösung bis pH 8,0

5. Ergebnisse

5.1 Phänotypische Resistenzbestimmung

5.1.1 Varicella-Zoster-Virus-Referenzstamm vOka

Nach Abschluss der phänotypischen Resistenztestung wurde das arithmetische Mittel der IC₅₀-Werte für jedes Virostatikum gegenüber *vOka* gebildet. Das Ergebnis für ACV setzte sich aus 41 Einzelwerten zusammen und betrug $0,67 \pm 0,15 \mu\text{g/ml}$ ($2,98 \pm 0,67 \mu\text{M}$). Drei IC₅₀-Werte von PCV bildeten einen Mittelwert von $1,32 \pm 1,21 \mu\text{g/ml}$ ($4,75 \pm 4,35 \mu\text{M}$). Das Ergebnis für BVDU wurde aus drei Werten berechnet und betrug $0,012 \pm 0,01 \mu\text{g/ml}$ ($0,04 \pm 0,03 \mu\text{M}$). Für TPF ergab sich aus drei Einzelergebnissen ein mittlerer IC₅₀-Wert von $31,59 \pm 13,30 \mu\text{g/ml}$ ($164,57 \pm 69,29 \mu\text{M}$) und für CDV ein Ergebnis von $0,67 \pm 0,33 \mu\text{g/ml}$ ($2,45 \pm 1,10 \mu\text{M}$), bestehend aus vier Einzelwerten. Da eine Resistenz erst ab einer IC₅₀-Erhöhung über das Vierfache des Referenzwertes vorlag, ergab sich für jede antivirale Substanz ein Grenzwert. Für ACV lag dieser Cut-off bei $2,68 \pm 0,6 \mu\text{g/ml}$, für PCV bei $5,28 \pm 4,84 \mu\text{g/ml}$, für BVDU bei $0,048 \pm 0,04 \mu\text{g/ml}$, für TPF bei $126,36 \pm 53,2 \mu\text{g/ml}$ und für CDV bei $2,68 \pm 1,32 \mu\text{g/ml}$. Der Tab. 22 sind die Mittelwerte und die ermittelten Cut-off-Werte für eine Resistenz zu entnehmen.

Tab. 22 IC₅₀-Mittelwerte und Cut-offs des Referenzstamms *vOka* (1002/08)

Substanz (Anzahl der Untersuchungen)	IC ₅₀ - Wert		Cut-off	
	($\mu\text{g/ml}$)	(μM)	($\mu\text{g/ml}$)	(μM)
ACV (n= 41)	$0,67 \pm 0,15$	$2,98 \pm 0,67$	$2,68 \pm 0,6$	$11,92 \pm 2,68$
PCV (n= 3)	$1,32 \pm 1,21$	$4,75 \pm 4,35$	$5,28 \pm 4,84$	$19 \pm 17,4$
BVDU (n= 3)	$0,012 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,03$	$0,048 \pm 0,04$	$0,16 \pm 0,12$
TPF (n= 3)	$31,59 \pm 13,30$	$164,57 \pm 69,29$	$126,36 \pm 53,2$	$658,28 \pm 277,16$
CDV (n= 4)	$0,67 \pm 0,33$	$2,45 \pm 1,10$	$2,68 \pm 1,32$	$9,8 \pm 4,4$

5.1.2 Patientenisolat

VZV-Isolate von Patienten ohne bekannte antivirale Therapie

Der Plaquereduktionstest wurde bei 49 VZV-Isolaten, die von Patienten ohne bekannte antivirale Therapie stammten, mit ACV durchgeführt. Zusätzlich wurde das Isolat *pOka* (1003/08) ebenfalls als sensitiver Referenzstamm mitgeführt. Die errechneten ACV-Konzentrationen, die eine 50%ige Hemmung des Virus hervorrufen, lagen in einem Bereich zwischen $0,27$ und $1,32 \mu\text{g/ml}$ ($1,20$ und $5,87 \mu\text{M}$). Da von einer Resistenz erst ab einem

Grenzwert von $2,68 \pm 0,6 \mu\text{g/ml}$ ($11,92 \pm 2,68 \mu\text{M}$) ausgegangen wurde, konnte bei allen Patientenisolaten eine ACV-Sensitivität nachgewiesen werden. Die IC_{50} -Werte jedes einzelnen VZV-Stammes können der Tab. 23 entnommen werden.

Tab. 23 Ergebnisse des Plaquereduktionstests der Aciclovir-empfindlichen VZV-Stämme

Lfd. Nr.	VZV-Stamm	IC_{50} ACV ($\mu\text{g/ml}$)	Lfd. Nr.	VZV-Stamm	IC_{50} ACV ($\mu\text{g/ml}$)
1	0413/00	0,90	26	0492/05	1,32
2	0417/03	0,75	27	0528/05	0,51
3	1328/03	1,17	28	0551/05	0,43
4	2308/03	0,39	29	0847/05	0,27
5	2342/03	0,40	30	1015/05	0,60
6	0204/04	0,78	31	1078/05	0,33
7	0235/04	0,56	32	1211/05	0,48
8	0281/04	0,40	33	1483/05	0,58
9	0329/04	0,50	34	1621/05	0,36
10	0875/04	0,70	35	0482/06	1,25
11	1243/04	0,65	36	0784/06	0,39
12	1251/04	1,12	37	0927/06	0,96
13	1256/04	0,65	38	1078/06	0,59
14	1499/04	0,94	39	1571/06	0,62
15	1533/04	0,56	40	0052/07	0,28
16	1762/04	0,71	41	0445/07	0,85
17	2098/04	0,43	42	0446/07	0,82
18	2205/04	0,57	43	1219/07	0,64
19	0003/05	0,50	44	1805/07	0,66
20	0134/05	0,27	45	0457/08	0,53
21	0168/05	0,54	46	1279/08	0,45
22	0189/05	0,80	47	1330/08	0,64
23	0217/05	0,43	48	1637/08	0,63
24	0218/05	0,57	49	2926/08	0,78
25	0248/05	1,10	50	pOka	0,49

Bei drei VZV-Stämmen (1499/04, 0189/05, 1637/08) wurde aufgrund der genotypischen Befunde (s. Tab. 30, S. 55) zusätzlich die Empfindlichkeit gegenüber TPF bestimmt. Die IC_{50} -Werte zeigten eine Sensitivität und sind in der Tab. 24 dargestellt.

Tab. 24 Ergebnisse des Plaquereduktionstests von drei TPF-empfindlichen VZV-Isolaten

Lfd. Nr.	VZV-Stamm	IC_{50} TPF ($\mu\text{g/ml}$)
1	1499/04	21,4
2	0189/05	22,2
3	1637/08	23,7

VZV-Isolate mit klinischer Aciclovir-Resistenz

Da bei zwei Patientenisolaten ein Verdacht auf eine ACV-Resistenz vorlag, wurde bei ihnen die IC_{50} von ACV, PCV, BVDU, TPF und CDV ermittelt. Eine ACV-Resistenz konnte phänotypisch nur bei dem Stamm 1704/04 bestätigt werden, da sowohl der IC_{50} -Wert von ACV mit 18,02 $\mu\text{g/ml}$ (80,00 μM), als auch von PCV mit 20,10 $\mu\text{g/ml}$ (72,30 μM) und BVDU mit 2,80 $\mu\text{g/ml}$ (8,41 μM) weit über dem Vierfachen der IC_{50} -Werte des *vOka*-Stamms lag. Eine Sensitivität bestand gegenüber den beiden TK-unabhängigen Medikamenten TPF und CDV, was durch die Konzentrationen der 50%igen Virushemmung, für TPF mit 8,30 $\mu\text{g/ml}$ (43,24 μM) und für CDV mit 0,24 $\mu\text{g/ml}$ (0,88 μM) belegt wurde. Der zweite Patientenstamm mit klinischer ACV-Resistenz (3532/09) verfügte mit 1,38 $\mu\text{g/ml}$ (6,13 μM) über einen gering erhöhten IC_{50} -Wert für ACV, war aber unter Berücksichtigung des Cut-offs von $2,68 \pm 0,6$ $\mu\text{g/ml}$ ($11,92 \pm 2,68$ μM) eindeutig als sensitiv einzustufen. Das Ergebnis für PCV war mit 4,50 $\mu\text{g/ml}$ (16,19 μM) ebenfalls geringfügig erhöht, und das Resultat für BVDU lag mit 0,0015 $\mu\text{g/ml}$ (0,005 μM) unter dem Referenzwert. Auch auf TPF und CDV reagierte dieser Virusstamm empfindlich. Das zeigten die ermittelten IC_{50} -Werte, die für TPF bei 23,18 $\mu\text{g/ml}$ (120,75 μM) und für CDV bei 0,36 $\mu\text{g/ml}$ (2,20 μM) lagen. In Tab. 25 sind die Ergebnisse der beiden Patientenisolate zusammengefasst.

Tab. 25 Ergebnisse des Plaquereduktionstests der Patientenisolate mit klinischer Aciclovir-Resistenz

VZV-Stamm	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)				
	ACV	PCV	BVDU	TPF	CDV
1704/04	18,02	20,10	2,80	8,30	0,24
3532/09	1,38	4,50	0,0015	23,18	0,36

5.2 Genotypische Resistenzbestimmung

5.2.1 *Varicella-Zoster-Virus-Referenzstämme*

Sequenzvergleich des Thymidinkinasegens

Im TK-Gen gibt es fünf Nukleotide (Nt), deren Basen zwischen den Referenzstämmen variieren. An der Position 183 unterscheiden sich die Stämme *vOka* und *pOka* mit Thymin (T) still von den restlichen Referenzstämmen, die Cytosin (C) als Base enthalten. Bei Nt 399 weicht nur der Genotyp 4 mit einer stillen Mutation ab, da bei ihm C durch T ersetzt ist. An der Stelle 792 enthalten alle Referenzstämme Guanin (G), mit Ausnahme des Stammes *11*, bei dem stattdessen Adenin (A) vorhanden ist. Dieser Austausch führt jedoch zu keiner Veränderung der Aminosäure (AS)-Sequenz. An der Nt-Position 863 weicht als einziger

Referenzstamm *Dumas* ab, bei welchem diese Stelle anstatt mit T durch C besetzt ist. Diese Substitution führt zu einem AS-Wechsel an Position 288, in der Leucin (Leu) durch Serin (Ser) ausgetauscht wird. Eine weitere Nt-Position ist 956, an der in fast allen Genotypen C vorhanden ist. Jedoch unterscheidet sich Stamm 8 des Genotyps 4 durch T von den anderen. Auch diese Veränderung hat eine AS-Substitution von Alanin (Ala) zu Valin (Val) zur Folge, welche an Position 319 auftritt. In Tab. 26 sind die beschriebenen Veränderungen zusammengefasst.

Tab. 26 Sequenzunterschiede im Thymidinkinasegen in Abhängigkeit der VZV-Genotypen

VZV-Referenzstamm	Genotyp	5' → 3' Nt-Position				
		183	399	792	863	956
Dumas	1	C	C	G	C	C
VZV pOka	2	T	C	G	T ¹	C
VZV vOka	2	T	C	G	T ¹	C
VZV 11	3	C	C	A	T ¹	C
VZV 8	4	C	T	G	T ¹	T ²
VZV CA123	5	C	C	G	T ¹	C

¹ nicht-synonyme Mutation Leu288Ser

² nicht-synonyme Mutation Ala319Val

Sequenzvergleich des DNA-Polymerasegens

Das DNA-Pol-Gen enthält bei den Referenzstämmen insgesamt neun Positionen, an denen Unterschiede auftreten. Die erste betrifft eine stille Mutation des Nt 78, welches bei Stamm *CA123* anstelle von C ein T enthält. Beim Genotyp 2 führt der Austausch von G zu T an Position 556 zu einer AS-Substitution, bei welcher die 186. Aminosäure Glycin (Gly) durch Cystein (Cys) ersetzt ist. Der SNP G1035A ist nur bei VZV 8 enthalten. Im Nt 1102 besitzen die Stämme *Dumas*, *11* und *CA123* C, aber die anderen drei T. Außerdem enthält VZV *CA123* auch bei Nt 1632 diesen Basenaustausch. Diese Veränderungen führen zu keiner abweichenden AS-Abfolge. Die stillen Nt-Substitutionen C1812T und G2697A sind zwei weitere Stellen, an denen nur *pOka* und *vOka* eine Veränderung aufweisen. Die Genotypen 2, 4 und 5 enthalten den AS-Austausch von Ser863 zu Gly, welcher aus dem SNP A2587G resultiert. Die letzte Veränderung ist ein T, welches beim Genotyp 2 durch C ersetzt ist. Davon ist die Nt-Position 3475 betroffen. Die Folge ist eine AS-Substitution von Cys1159 zu Arginin (Arg). In Tab. 27 sind auch diese Veränderungen zusammengefasst.

Tab. 27 Sequenzunterschiede im DNA-Polymerasegen in Abhängigkeit der VZV-Genotypen

VZV-Referenzstamm	Genotyp	5' → 3' Nt-Position								
		78	556	1035	1102	1632	1812	2587	2697	3475
Dumas	1	C	G	G	C	T	C	A	G	T
VZV pOka	2	C	T ¹	G	T	T	T	G ²	A	C ³
VZV vOka	2	C	T ¹	G	T	T	T	G ²	A	C ³
VZV 11	3	C	G	G	C	T	C	A	G	T
VZV 8	4	C	G	A	T	T	C	G ²	G	T
VZV CA123	5	T	G	G	C	C	C	G ²	G	T

¹ nicht-synonyme Mutation Gly186Cys

² nicht-synonyme Mutation Ser863Gly

³ nicht-synonyme Mutation Cys1159Arg

Da eine ACV-Resistenz der Referenzstämmen nicht bekannt ist, kann davon ausgegangen werden, dass keine der vorhandenen AS-Substitutionen, sollten sie in Patientenstämmen vorkommen, für eine ACV-Resistenz verantwortlich ist. Sie sind in solchen Fällen lediglich Bestandteil des natürlichen Genpolymorphismus.

5.2.2 Aciclovir-sensitive Patientenstämmen

Im Verlauf der Sequenzierung des TK- und DNA-Pol-Gens von 49 ACV-sensitiven Patientenstämmen sowie der zwei Referenzstämmen *vOka* (1002/08) und *pOka* (1003/08) wurden insgesamt 31 verschiedene SNPs gefunden. Davon befanden sich sieben im TK-Gen und 24 im DNA-Pol-Gen. Es resultierten daraus sieben unterschiedliche AS-Substitutionen in der DNA-Pol und eine in der TK.

Thymidinkinasegen

Während der Sequenzierung des TK-Gens konnte festgestellt werden, dass in jedem Stamm, unabhängig vom Genotyp, der SNP C863T vorhanden war, woraus die AS-Substitution Ser288Leu resultierte. Der Referenzstamm *Dumas* stellt eine Ausnahme dar, denn bei ihm fehlt dieser Polymorphismus. In den meisten ACV-sensitiven VZV-Stämmen war das die einzige Genomveränderung, die im TK-Gen festgestellt werden konnte. Allerdings gab es sieben VZV-Stämme, bei denen weitere Abweichungen gefunden wurden, die jedoch zu keiner AS-Substitution führten. Dazu gehörte der Stamm 1621/05 des Genotyps 1 mit einem Basenaustausch von A zu G im Nt 924. Weitere SNPs gab es in vier Stämmen des Genotyps 3. Bei 1762/04 und 1499/04 war an Position 237 T durch C ersetzt, und im Stamm 0329/04 waren die Substitutionen G306A und C312T enthalten. Weiterhin befand sich im Stamm 1533/04 ein Polymorphismus an Stelle 162, wobei G anstelle von T zu finden war. In Tab. 28

sind die VZV-Stämme dargestellt, welche außer dem SNP C863T noch zusätzliche synonyme Mutationen enthielten. Die als Kontrollstämme mitgeführten Vertreter des Genotyps 2 *vOka* (1002/08) und *pOka* (1003/08) enthielten außer dem SNP C863T beide eine Variation des Nt 183 mit T anstelle von C, was Tab. 29 entnommen werden kann. Diese Veränderung kam auch in den entsprechenden Referenzstämmen von *vOka* und *pOka* der Genbank vor.

Tab. 28 Mutationen im Thymidinkinasegen Aciclovir-sensitiver Patientenstämmen

Lfd. Nr.	VZV-Stamm	Genotyp	Nt-Veränderung 5' → 3'	AS-Substitution	Literaturreferenzen*
1	1621/05	1 (n=17)	C863T A924G	Ser288Leu ----	1,2,3,4 Ohne Referenz
2	0329/04	3 (n=16)	G306A C312T C863T	---- ---- Ser288Leu	Ohne Referenz Ohne Referenz 1,2,3,4
3	1499/04		T237C C863T	---- Ser288Leu	Ohne Referenz 1,2,3,4
4	1533/04		T162G C863T	--- Ser288Leu	Ohne Referenz 1,2,3,4
5	1762/04		T237C C863T	---- Ser288Leu	Ohne Referenz 1,2,3,4

*1 Morfin et al. 1999, 2 Sawyer et al. 1988, 3 Saint-Leger et al. 2001, 4 Boivin et al. 1994

Tab. 29 Mutationen im Thymidinkinasegen der Kontrollstämme

Lfd. Nummer	VZV-Stamm	Genotyp	Nt-Veränderung 5' → 3'	AS-Substitution	Literaturreferenzen*
1	1002/08	2 (n=2)	C183T C863T	---- Ser288Leu	2 1,2,3,4
2	1003/08		C183T C863T	---- Ser288Leu	2 1,2,3,4

*1 Morfin et al. 1999, 2 Sawyer et al. 1988, 3 Saint-Leger et al. 2001, 4 Boivin et al. 1994

DNA-Polymerasegen

Durch die Sequenzierung des DNA-Pol-Gens konnten bei 28 von insgesamt 49 ACV-sensitiven Patientenstämmen sowie den Kontrollstämmen *vOka* (1002/08) und *pOka* (1003/08) Veränderungen im Genom, verglichen mit dem Stamm *Dumas*, festgestellt werden. Die anderen 21 enthielten keine Abweichungen.

Im DNA-Pol-Gen von fünf VZV-Stämmen des Genotyps 1 konnten SNPs gefunden werden, von denen jedoch keiner zu einer Veränderung der Primärstruktur des Proteins führte. Im Stamm 2342/03 befand sich an zwei Stellen, Nt 51 und 1647, A anstatt G in der Basenabfolge, und bei dem Material 2205/04 war T an der Position 432 durch C ersetzt. Das Nt 555 des VZV-Stamms 0528/05 unterschied sich mit T von *Dumas*, welcher dort C trägt. Ein Basenaustausch von A zu C wurde im Stamm 0204/04 an der Position 1095 gefunden, und bei 0492/05 war die Stelle 3006 nicht mit T, sondern mit C besetzt.

Unter den Vertretern des Genotyps 3 wurden acht VZV-Stämme gefunden, die sich vom Referenzstamm unterschieden. Der SNP A1239G befand sich nur im Stamm 0847/05, wogegen die Substitution A1962G in den folgenden vier Stämmen vorkam: 2308/03, 1571/06, 0927/06 und 0052/07. Außerdem konnte im Stamm 1078/06 der Ersatz von A durch C an Nt-Position 2706 nachgewiesen werden. Die Sequenzanalyse des Materials 03/05 wies zwei Abweichungen auf. Einerseits die Stelle 1632 mit C anstatt T und andererseits die Stelle 2587, an der sich nicht A, sondern G befand. Letztere führte zu einer AS-Substitution von Ser zu Gly an Position 863. Auch der VZV-Stamm 1499/04 wies zwei veränderte AS auf. Zum einen statt Methionin (Met)²⁸⁶ Isoleucin (Ile) verursacht durch die Punktmutation G858T, und zum anderen den Austausch von Histidin (His) an Position 1089 durch Tyrosin (Tyr), dem die Mutation C3265T zu Grunde lag. Des Weiteren war in diesem Patientenmaterial der SNP G1248A vorhanden. Da die DNA-Pol-Polymorphismen Met²⁸⁶Ile und His¹⁰⁸⁹Tyr bislang nicht in der Literatur beschrieben wurden, wurde in den phänotypischen Untersuchungen eine TPF-Resistenz ausgeschlossen.

Von allen untersuchten ACV-sensitiven VZV-Stämmen des Genotyps 5 gab es nur einen (1251/04), der keine veränderte Gensequenz im Vergleich zu *Dumas* besaß. Variationen des Genoms konnten in den verbliebenen 13 Stämmen gefunden werden, von denen alle außer 0189/05 an der Position 1632 nicht T, sondern C und zusätzlich im Nt 2587 G anstelle von A enthielten. Die letztere Punktmutation führte zu einer Substitution von Ser zu Gly bei AS 863. Zusätzlich zu diesen beiden Mutationen kam bei den Stämmen 0413/00, 0445/07, 0446/07 und 2926/08 der SNP C78T vor, ohne eine AS-Substitution zu verursachen. Eine weitere Punktmutation enthielt Stamm 1637/08 an der Nt-Position 2470, die hier durch C anstatt von G besetzt war, woraus der Aminosäurewechsel von Glutaminsäure (Glu) zu Glutamin (Gln) an der AS-Position 824 resultierte. Im Material 0413/00 wurde C als Base des 895. Nt durch T ersetzt, was aber nicht zu einer Veränderung der AS-Abfolge führte. Die letzte Mutation G2951A kam im Stamm 0189/05 vor und verursachte eine veränderte Primärstruktur der DNA-Pol, da die normalerweise vorkommende AS Arg an der Position 984 durch His ausgetauscht wurde. Auch bei den VZV-Isolaten 0189/05 und 1637/08 konnte eine TPF-Resistenz ausgeschlossen werden. Außer den bereits beschriebenen Nt-Substitutionen C895T, G2470C und G2951A kamen alle anderen SNPs auch im Referenzstamm VZV *CA123* vor und hatten keinen Einfluss auf die Funktion des Proteins.

Auch in den zwei VZV-Stämmen, deren Genotyp nicht klassifiziert werden konnte, wurden Nt-Substitutionen gefunden. Beide trugen an Position 2587 nicht A, sondern G, woraus sich die bereits oben beschriebene AS-Veränderung ergab und der Stamm 0457/08 enthielt

zusätzlich noch den SNP T1428C. Die beiden Kontrollstämme *vOka* (1002/08) und *pOka* (1003/08), zugehörig zum Genotyp 2, enthielten beide die sechs Nt-Veränderungen, welche bereits im Vergleich der Referenzstämme aus der Genbank beschrieben wurden (s. 5.2.1, Tab. 27). Zusätzlich wurde im Stamm *pOka* der Polymorphismus T1632C nachgewiesen, der jedoch nicht mit einer AS-Substitution einherging. Die Tab. 30 und 31 fassen die ACV-sensitiven Patientenstämme und die Kontrollstämme mit ihren Veränderungen im DNA-Pol-Gen zusammen.

Tab. 30 Mutationen im DNA-Polymerase-Gen Aciclovir-sensitiver Patientenstämme

Lfd. Nr.	VZV-Stamm	Genotyp	Nt-Veränderung 5'→3'	AS-Substitution	Literaturreferenzen*	
1	2342/03	1 (n=17)	G51A	----	Ohne Referenz	
2	0204/04		G1647A	----	Ohne Referenz	
3	2205/04		A1095C	----	Ohne Referenz	
4	0492/05		T432C	----	Ohne Referenz	
5	0528/05		T3006C	----	Ohne Referenz	
6	2308/03	3 (n=16)	C555T	----	Ohne Referenz	
7	1499/04**		A1962G	----	Ohne Referenz	
8	0003/05		G858T	Met286Ile	Ohne Referenz	
9	0847/05		G1248A	----	1	
10	0052/07		C3265T	His1089Tyr	Ohne Referenz	
11	0927/06		T1632C	----	1	
12	1078/06		A2587G	Ser863Gly	1,2	
13	1571/06		A1239G	----	Ohne Referenz	
14	0413/00		A1962G	----	Ohne Referenz	
15	0875/04		A2706C	----	Ohne Referenz	
16	1243/04		A1962G	----	Ohne Referenz	
17	0134/05	5 (n=14)	C78T	----	1	
18	0189/05**		C895T	----	1	
19	0217/05		T1632C	----	1	
20	0445/07		A2587G	Ser863Gly	1,2	
21	0446/07		T1632C	----	1	
22	1805/07		A2587G	Ser863Gly	1,2	
23	1279/08		T1632C	----	1	
24	1330/08		A2587G	Ser863Gly	1,2	
25	1637/08**		T1632C	----	1	
26	2926/08		A2587G	Ser863Gly	Ohne Referenz 1,2	
27	1483/05		Nicht Klassifiziert (n=2)	C78T	----	1
28	0457/08			T1632C	----	1
				A2587G	Ser863Gly	1,2
				T1428C	----	Ohne Referenz
			A2587G	Ser863Gly	1,2	

*1 Visse et al. 1999, 2 Visse et al. 1998

** Phänotypische Resistenztestung: TPF-sensitiv

Tab. 31 Mutationen im DNA-Polymerase-Gen der Kontrollstämme

Lfd. Nr.	VZV-Stamm	Genotyp	Nt-Veränderung 5' → 3'	AS-Substitution	Literaturreferenzen*
1	1002/08	2 (n=2)	G556T	Gly186Cys	1
			C1102T	----	1
			C1812T	----	1
			A2587G	Ser863Gly	1,2
			G2697A	----	1
			T3475C	Cys1159Arg	3
2	1003/08		G556T	Gly186Cys	1
			C1102T	----	1
			T1632C	----	1
			C1812T	----	1
			A2587G	Ser863Gly	1,2
			G2697A	----	1
T3475C	Cys1159Arg	3			

*1 Visse et al. 1999, 2 Visse et al. 1998, 3 Kamiyama et al. 2001

Im Vergleich des Auftretens der vorkommenden SNPs konnte festgestellt werden, dass bei den VZV-Stämmen des Genotyps 1 keine Gemeinsamkeiten vorhanden waren. Im Gegensatz dazu enthielten beide Kontrollstämme des Genotyps 2 die SNPs G556T, C1102T, C1812T, A2587G, G2697A und T3475C. Da diese Konstellation bei keinem Vertreter eines anderen Genotyps vorkam, könnte sie charakteristisch für diesen Genotyp sein. Die Nt-Substitution A1962G war bei vier VZV-Stämmen des Genotyps 3 zu finden, aber bei keinem Stamm eines anderen Genotyps. Besonders auffällig war das gemeinsame Auftreten der beiden SNPs T1632C und A2587G, da sie bis auf zwei Ausnahmen in allen Vertretern des Genotyps 5 vorkamen. Außerdem konnte bei vier dieser 14 Stämme die Nt-Veränderung C78T nachgewiesen werden. Dieser SNP wurde bei keinem VZV-Stamm eines anderen Genotyps gefunden. Die nicht klassifizierbaren Patientenstämme enthielten keine charakteristischen Nt-Substitutionen. Der SNP A2587G kam zwar bei beiden vor, jedoch war er auch bei VZV-Stämmen der Genotypen 2, 3 und 5 zu finden.

Die AS-Substitution Ser863Gly kam mit zwei Ausnahmen in allen VZV-Stämmen des Genotyps 5 vor. Im Gegensatz dazu konnte sie nur bei einem Vertreter des Genotyps 3 nachgewiesen werden. Die Gruppe des Genotyps 1 enthielt diese AS-Veränderung jedoch überhaupt nicht. Mit Hilfe des Fisher-Exakt-Tests wurde statistisch analysiert, ob ein Zusammenhang zwischen dem AS-Profil der DNA-Pol in ACV-sensitiven VZV-Stämmen und den Genotypen 1, 3 und 5 besteht. Es konnte belegt werden, dass das AS-Profil mit der Substitution Ser863Gly charakteristisch für den Genotyp 5 ist und sich signifikant von dem der Genotypen 1 und 3 unterscheidet ($p_1=0,00063$; $p_3=0,0065$). Die beiden zuletzt genannten Genotypen zeigen im Bezug auf die AS-Substitution Ser863Gly keine signifikanten Differenzen ($p=0,485$).

5.2.3 Patientenstämme mit klinischer Aciclovir-Resistenz

Durch die Sequenzierung von ORF 29 und 36 der zehn VZV-Stämme, bei denen eine ACV-Resistenz vermutet wurde, konnten insgesamt 14 Änderungen der Nt-Sequenz gefunden werden. Davon führten acht zu einer AS-Substitution und zwei zu einem frühzeitigen Stoppcodon. Im DNA-Pol-Gen sind nur drei dieser AS-Wechsel zu finden, und alle Verbleibenden befinden sich im TK-Gen.

Patientenstämme mit Genpolymorphismen

Erneut konnte im TK-Gen jedes Stammes der SNP C863T mit der resultierenden AS-Veränderung an Position 288 nachgewiesen werden, in der Ser durch Leu ersetzt wurde. Zusätzlich befand sich im DNA-Pol-Gen des Patientenstamms 0940/09 der SNP C2901T. Dieser nahm aber keinen Einfluss auf die Primärstruktur des Proteins. Bei vier VZV-Stämmen konnte keine genetische Ursache für eine bestehende Resistenz gefunden werden. Es waren lediglich natürliche Genpolymorphismen nachzuweisen, die zum Teil noch nicht in der Literatur beschrieben wurden. Dazu gehörten zum einen die Stämme 0154/05 und 2707/09, bei denen zusätzlich zur vorhanden Substitution C863T weder im TK-Gen noch im DNA-Pol-Gen eine Veränderung im Genom gefunden werden konnte. Zum anderen enthielt das Patientenmaterial 0152/10 neben der bereits erwähnten Abweichung im TK-Gen nur im DNA-Pol-Gen eine Veränderung. Diese betraf die Stelle 729, an der T durch C ersetzt wurde, was jedoch nicht zur Änderung der AS-Abfolge führte. Ebenso besaß der VZV-Stamm 3532/09 nur im DNA-Pol-Gen Variationen, welche die beiden SNPs G288A und T1632C beinhalteten. Zusätzlich war das Nt 2587 mit G besetzt und trug nicht wie der Referenzstamm *Dumas A*, woraus die AS-Substitution Ser863Gly resultierte. Die beschriebenen Polymorphismen sind in der folgenden Tab. 32 dargestellt.

Tab. 32 Natürliche Genpolymorphismen der VZV-Stämme mit klinischer Aciclovir-Resistenz

Lfd. Nr.	VZV-Stamm	Genotyp	TK-Gen		DNA-Pol-Gen	
			Nt-Veränderung 5' → 3'	AS-Substitution	Nt-Veränderung 5' → 3'	AS-Substitution
1	1704/04	1	C863T	Ser288Leu* ¹	----	----
2	0154/05	1/3	C863T	Ser288Leu* ¹	----	----
3	0757/08	1/3	C863T	Ser288Leu* ¹	----	----
4	0679/09	1/3	C863T	Ser288Leu* ¹	----	----
5	0940/09	1/3	C863T	Ser288Leu* ¹	C2901T	----
6	1049/09	1/3	C863T	Ser288Leu* ¹	----	----
7	2707/09	1/3	C863T	Ser288Leu* ¹	----	----
8	2817/09	3	C863T	Ser288Leu* ¹	----	----
9	3532/09	3	C863T	Ser288Leu* ¹	G288A T1632C* ² A2587G	---- ---- Ser863Gly* ^{2,3}
10	0152/10	3	C863T	Ser288Leu* ¹	T729C	-----

Referenzen: *¹ Morfin et al. 1999, 2 Sawyer et al. 1988, 3 Saint-Leger et al. 2001, 4 Boivin et al. 1994

*² Visse et al. 1999

*³ Visse et al. 1998

Rot markiert: ohne Referenz

Patientenstämme mit einer Aciclovir-Resistenz

Bei sechs der zehn Patientenstämme mit klinischer ACV-Resistenz konnte mit hoher Wahrscheinlichkeit eine genetische Ursache für eine bestehende ACV-Resistenz nachgewiesen werden. Die TK-Gensequenz der Patientenprobe 1704/04 wies eine Besonderheit an der Nt-Position 673 auf, da dort ein Doppelpeak vorhanden war (s. Abb. 14). Befand sich im Nt 673 T, wie im Referenzstamm, kam es zu keiner Strukturveränderung. Wenn allerdings die Base durch A ausgewechselt wurde, wurde an der Stelle von Tryptophan (Trp) Arg als AS 225 gebildet. Eine ähnliche Konstellation kam bei Material 2817/09 im Nt 217 des TK-Gens vor. Dort befand sich im Referenzstamm C, aber in dem Patientenstamm kam sowohl C als auch A vor (s. Abb. 14). Wenn letzteres in die DNA eingebaut wurde, entstand an Stelle von Leu bei AS 73 Ile. Beide Befunde belegen im Patientenmaterial bzw. Virusisolat das Vorhandensein eines Gemisches aus Viren mit mutierter und nicht mutierter DNA des TK-Gens. Da in beiden Virusstämmen keine Veränderungen im DNA-Pol-Gen nachgewiesen werden konnten, sind die beschriebenen AS-Substitutionen mit hoher Wahrscheinlichkeit die Ursache für die beobachteten ACV-Resistenzen.

Bei dem VZV-Stamm 0679/09 war die nicht-synonyme Mutation, in der Threonin (Thr) an der AS-Position 256 durch Met ausgewechselt war, nachweisbar, welche höchstwahrscheinlich zur ACV-Resistenz geführt hat. Dieser Ersatz resultierte aus der Nt-Substitution C767T. Auch bei diesem Stamm gab es keine genetischen Besonderheiten im DNA-Pol-Gen. Der Stamm 0757/08 wies sowohl im TK- als auch im DNA-Pol-Gen

Abweichungen vom Referenzstamm *Dumas* auf. Die Mutation C907T im TK-Gen führte zur Entstehung eines Stopp-Codons an Position 303. Dies kann mit hoher Wahrscheinlichkeit als Ursache für die ACV-Resistenz angenommen werden. Zusätzlich wurde im DNA-Pol-Gen anstelle Ala als AS 955 Thr gebildet. Der dies verursachende Basenaustausch von G durch A befand sich im Nt 2863. Da diese Veränderung bislang nicht dokumentiert ist, bleibt ihre Bedeutung für eine Resistenz unklar. Auch im Patientenmaterial 0940/09 konnte ein frühzeitiges Stoppcodon aufgezeigt werden, welches die ACV-Resistenz verursacht haben muss. Es wurde an der AS-Position 334 gebildet und basierte auf der Addition eines zusätzlichen G im Nt 804, welches eine Leserasterverschiebung ab AS 269 verursachte. Des Weiteren wurde in diesem Stamm die 307. Base A durch C ersetzt. Dies führte zu der AS-Substitution von Lysin (Lys)103 zu Gln. Auch diese Mutation ist neu und kann in ihrer Bedeutung nicht eingeschätzt werden. Im DNA-Pol-Gen des VZV-Stamms 1049/09 bewirkte die Nt-Substitution C710A einen Austausch der AS Thr an Position 237 durch Lys. Diese Veränderung ist höchstwahrscheinlich als die Ursache für die bestehende ACV-Resistenz anzusehen, wobei ihr Auftreten im Rahmen des Polymorphismus nicht ausgeschlossen werden kann.

Alle Veränderungen der Basenabfolge, die zu einer Resistenz führen könnten, sind in Abb. 14 mit ihren entsprechenden Sequenzausschnitten dargestellt. Dabei ist zu beachten, dass die Sequenzen des DNA-Pol-Genes in der 3' → 5'-Leserichtung vorliegen und die dazugehörigen Positionsangaben ebenfalls dieser Ausrichtung unterliegen. Eine Zusammenfassung der nachgewiesenen Mutationen im TK- und DNA-Pol-Gen, welche eine ACV-Resistenz begründen könnten, gibt die Tab. 33 wieder.

Tab. 33 Mögliche Resistenz-assoziierte Mutationen in VZV-Patientenstämmen mit klinischer Aciclovir-Unempfindlichkeit

Lfd. Nr.	VZV-Stamm	Genotyp	TK-Gen		DNA-Pol-Gen	
			Nt-Veränderung 5' → 3'	AS-Substitution	Nt-Veränderung 5' → 3'	AS-Substitution
1	1704/04	1	T673→A	Trp225Arg	----	----
2	0757/08	1/3	C907→T	Gln303Stopp * ¹	G2863→A	Ala955Thr?
3	0679/09	1/3	C767→T	Thr256Met * ²	----	----
4	0940/09	1/3	A307→C Add.G804	Lys103→Gln? 269-frameshift- Asn334→Stopp	----	----
5	1049/09	1/3	----	----	C710→A	Thr237→Lys?
6	2817/09	3	C217→A	Leu73Ile	----	----

Rot markiert: Nt-Veränderungen und AS-Substitutionen ohne Referenz

Fett gedruckt: Resistenz-assoziierte Mutationen

*Referenzen: ¹ Fillet et al. 1998, Saint-Leger et al. 2001, ² Blyemehl et al. 2011

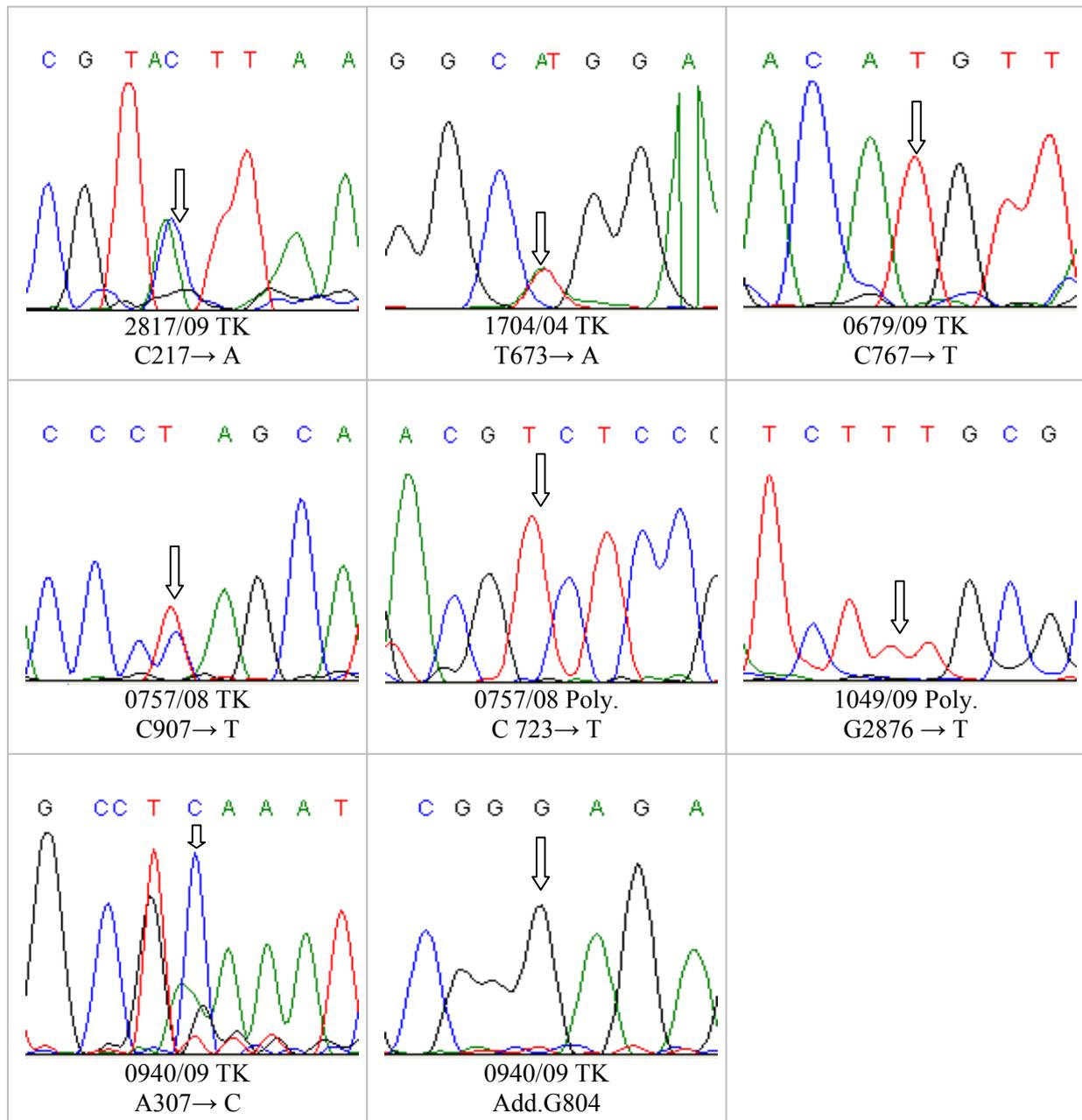


Abb. 14 Sequenzausschnitte mit den die Resistenz verursachenden Nt-Veränderungen
Betroffene Nucleotide sind durch einen Pfeil markiert.
Positionsangaben: TK-Gen 5'→3'; DNA-Pol-Gen: 3'→5'

6. Diskussion

Bereits seit ca. 1982 besteht ein wissenschaftliches Interesse an der Charakterisierung von ACV-resistenten VZV-Stämmen (Biron et al. 1982). Trotzdem liegen bisher nur wenige Erfahrungen zur Resistenztestung des VZV vor. Eine wesentliche Ursache dafür ist zum einen, dass Resistenzen des VZV bislang nur relativ selten beobachtet wurden. Zum anderen ist die Anzüchtung des VZV in der Zellkultur mit Problemen behaftet, weshalb die Bestimmung des Resistenzphänotyps nur in seltenen Fällen erfolgen kann. Die Bedeutung einer Resistenztestung ist jedoch groß, um betroffene Patienten rechtzeitig effektiv behandeln zu können. Der Verdacht auf eine vorliegende ACV-Resistenz stellt sich meist schon, wenn die antivirale Therapie nach ca. zehn Tagen keinen Erfolg zeigt. In diesen Fällen wird von einer klinischen Resistenz gesprochen (Balfour et al. 1994, Safrin et al. 1991). Meist sind Patienten mit einem eingeschränkten Immunsystem betroffen, wie z.B. nach einer Knochenmark- oder Stammzelltransplantation, mit AIDS oder mit einer Leukämie (Andrei et al. 2004). Der Nachweis einer tatsächlichen ACV-Resistenz muss jedoch mit virologischen Methoden erfolgen.

In der vorliegenden Arbeit sollten insbesondere die Erfahrungen mit der genotypischen Resistenzbestimmung des VZV erweitert werden. Dazu wurden insgesamt 59 klinische VZV-Stämme auf vorhandene Resistenzen untersucht, welche sich in zwei verschiedene Gruppen untergliedern lassen. Zum einen wurden 49 VZV-Stämme von Patienten ohne bekannte antivirale Therapie getestet. Diese reagierten phänotypisch empfindlich auf ACV. Ihre Genomveränderungen konnten demzufolge dem natürlichen Genpolymorphismus zugeordnet werden. Zum anderen wurden zehn VZV-Stämme von Patienten mit einer klinischen ACV-Resistenz untersucht. Von diesen konnte die phänotypische Resistenztestung nur bei zwei Stämmen durchgeführt werden. Die genotypische Untersuchung war jedoch bei allen möglich. Bei den VZV-Stämmen vorkommende AS-Substitutionen konnten als Hinweise für eine ACV-Resistenz angesehen werden. Für die phänotypische Resistenzbestimmung wurden die Virusstämme zuerst in humanen Zellen angezüchtet. Danach erfolgte die Ermittlung der IC_{50} -Werte von ACV für die sensitiven VZV-Stämme mit Hilfe des Plaquereduktionstests. Für drei der Stämme (1499/04, 0189/05, 1637/08) wurden zusätzlich die IC_{50} -Werte von TPF und für zwei klinisch resistente VZV-Stämme (1704/04, 3532/09) die 50%igen Hemmkonzentrationen von ACV, PCV, BVDU, CDV und TPF bestimmt. Der Schwerpunkt der Resistenztestungen lag jedoch auf der Genotypisierung mittels Amplifikation und Sequenzierung des TK- und DNA-Pol-Gens. Mit dem beschriebenen Vorgehen sollte zunächst der natürliche Polymorphismus der beiden Gene abgeklärt werden, um die

Interpretation von Resistenz-assoziierten Mutationen zu erleichtern. Im Weiteren sollten VZV-Stämme mit klinischer Resistenz genotypisch und, wenn möglich, neben der genotypischen Analyse auch phänotypisch hinsichtlich einer Resistenz geprüft werden.

6.1 Aciclovir-sensitive Varicella-Zoster-Virusstämme

Im Verlauf dieser Arbeit wurden 49 ACV-sensitive VZV-Isolate von Patienten mit Varizellen oder Zoster sowie zwei Referenzstämme genotypisch auf Mutationen im TK- und DNA-Pol-Gen getestet. Beide Gene des VZV gelten als Targets für antivirale Verbindungen, die für die Therapie von VZV-Infektionen zugelassen sind. Dazu zählen die Nukleosidanaloga ACV, PCV und BVUDU, welche zuerst spezifisch durch die virale TK zur Monophosphatform phosphoryliert werden. Die zweite und dritte Phosphorylierung erfolgt bei ACV und PCV durch zelluläre Kinasen, wogegen BVUDU auch das zweite Mal durch die virale TK phosphoryliert wird. Sobald die Triphosphate in die DNA eingebaut werden, hemmen sie die virale DNA-Pol kompetitiv und führen dadurch zu einem frühzeitigen Kettenabbruch (Saint-Léger et al. 2001, Talarico et al. 1993, De Clercq 2001). Zwei weitere Virostatika zur Behandlung einer VZV-Infektion sind TPF und CDV, wobei letzteres erst nach Aufklärung und Zustimmung des Patienten eingesetzt werden darf, da es nur zur Therapie einer CMV-Erkrankung zugelassen ist. Es ist ein TK-unabhängiges, azyklisches Nukleosidphosphat und wird von zellulären Enzymen in die diphosphorylierte Form umgewandelt, welche die virale DNA-Pol hemmt (Snoeck et al. 2000). TPF ist ebenfalls TK-unabhängig und hemmt als Pyrophosphatantagonist direkt die virale DNA-Pol nicht-kompetitiv. Es stellt das Mittel der Wahl dar, um ACV-resistente VZV-Infektionen zu therapieren (Chrip und Clissold 1991).

Natürliche Genpolymorphismen, auch wenn sie mit AS-Substitutionen einhergehen, haben normalerweise keinen Einfluss auf die Funktion der kodierten Enzyme. Ihre Kenntnis ist jedoch eine absolute Voraussetzung für die Interpretation von Resistenz-assoziierten Mutationen. In allen Virusstämmen der Genotypen 1, 2, 3 und 5 wurde im TK-Gen die AS-Substitution Ser288Leu gefunden, die auch bereits mehrfach in der Literatur beschrieben wurde. Einzig im Referenzstamm *Dumas* ist diese Mutation nicht vorhanden. Da sowohl die VZV-Stämme mit dieser Genomabweichung als auch der Referenzstamm gegenüber ACV sensitiv sind, verursacht diese AS-Substitution keine Resistenz (Sawyer et al. 1988, Boivin et al. 1994, Morfin et al. 1999, Saint-Léger et al. 2001). Zusätzlich waren in der vorliegenden Studie fünf unbekannte Nt-Substitutionen (A924G, G306A, C312T, T237C und T162G) zu finden, die jedoch keine AS-Veränderung nach sich ziehen und somit für eine mögliche

Resistenzentstehung nicht relevant sind. Der Nt-Austausch C183T befand sich in beiden Stämmen des Genotyps 2. Er wurde von Sawyer et al. (1988) in einer Studie publiziert, in der das TK-Gen von fünf Wildtyp- und vier ACV-resistenten VZV-Stämmen analysiert wurde. Diese wenigen Veränderungen des VZV-TK-Gens im Sinne eines natürlichen Genpolymorphismus stehen im Gegensatz zu dem ausgeprägten natürlichen TK-Genpolymorphismus des HSV-1 und HSV-2 (Burrell et al. 2010, Sauerbrei et al. 2010). Eine Ursache dafür kann darin bestehen, dass das TK-Gen des VZV stärker konserviert ist. In HSV-1-Stämmen kann das TK-Gen bis zu 12 nicht-synonyme Polymorphismus-assoziierte Mutationen enthalten (Sauerbrei et al. 2010, Bohn et al. 2011). Im Vergleich dazu ist der Polymorphismus des TK-Gens von HSV-2 deutlich geringer ausgeprägt (Chibo et al. 2004, Bohn et al. 2011). Die Unterschiede zwischen HSV und VZV machen deutlich, dass neue nicht-synonyme Mutationen im TK-Gen des VZV mit höherer Wahrscheinlichkeit Resistenz-assoziiert sind als beim HSV.

Während der Sequenzierung des DNA-Pol-Gens zeigte jeder VZV-Stamm der Gruppe des Genotyps 5 die AS-Substitution Ser863Gly. Bei dem Genotyp 1 kam diese nicht vor, und von den Virusstämmen der Genotypen 2 und 3 wiesen zwei bzw. einer diese Mutation auf. Dies deutet darauf hin, dass die Genomvariationen im DNA-Pol-Gen möglicherweise Genotyp-abhängig sind. Da die Substitution Ser863Gly bei zahlreichen ACV-sensitiven VZV-Stämmen auftritt, kann sie nicht mit einer Resistenz in Verbindung gebracht werden (Visse et al. 1998). In verschiedenen ACV-sensitiven Stämmen der Genotypen 3 und 5 konnten weitere Mutationen nachgewiesen werden, die keinen Einfluss auf die ACV-Empfindlichkeit der Stämme besitzen. Dazu gehören die AS-Substitutionen Met286Ile, Glu824Gln, Arg984His und His1089Tyr, welche in der aktuellen Literatur noch nicht beschrieben wurden. Glu824Gln befindet sich in der konservierten Region des DNA-Pol-Gens und könnte die Empfindlichkeit des Stammes 1637/08 gegenüber TPF beeinflussen. Dies ist jedoch nicht der Fall, da der IC_{50} -Wert von TPF mit 23,7 $\mu\text{g/ml}$ eindeutig eine Sensitivität gegenüber TPF anzeigte. Auch für die Substitutionen Met286Ile und His1089Tyr im VZV-Stamm 1499/04 und Arg984His im Stamm 0189/05 konnte mit Hilfe des Plaquereduktionstests eine TPF-Resistenz ausgeschlossen werden. Auffallend ist der deutlich stärkere DNA-Pol-Genpolymorphismus bei Vertretern des Genotyps 2 im Vergleich zu den anderen bisher beschriebenen Genotypen. Die beiden VZV-Stämme *vOka* und *pOka* wiesen sechs Nt-Substitutionen auf, von denen aber nur drei eine Veränderung der AS-Sequenz bewirken. Gly186Cys, Ser863Gly und Cys1159Arg liegen außerhalb der konservierten Regionen und sind mit dem natürlichen Polymorphismus dieser Stämme assoziiert (Kamiyama et al. 2001).

Der Virusstamm *pOka* enthielt zusätzlich den Nt-Austausch T1632C, der zwar keinen Einfluss auf die AS-Abfolge nimmt, aber in der Referenzsequenz aus der Genbank (Accessionsnummer: AB097933) nicht zu finden war. Dieser neu aufgetretene Polymorphismus könnte durch die zahlreichen Zellkulturpassagen entstanden sein, die mit diesem Laborstamm seit seiner Isolierung und ursprünglichen Charakterisierung bereits durchgeführt wurden. Insgesamt ist der natürliche Polymorphismus des DNA-Pol-Gens des VZV im Vergleich zum TK-Gen deutlich ausgeprägter. Er zeigt jedoch ebenfalls nicht die Dimension von HSV-1- und HSV-2-Stämmen (Bohn et al. 2011). Wie die vorliegenden Befunde zeigen, wurden zahlreiche Polymorphismen des VZV-DNA-Pol-Gens bislang nicht beschrieben.

Zur Beschreibung des natürlichen Genpolymorphismus in Abhängigkeit von dem Genotyp wurden die Claden 1, 3 und 5 ausgewählt, da diese in Deutschland vorherrschend sind (Sauerbrei et al. 2011). Die AS-Substitution Ser288Leu im TK-Gen war bei jedem VZV-Stamm der Genotypen 1, 3 und 5 zu finden und stellt kein spezifisches Merkmal dar. Charakteristisch für den Genotyp 5 ist die AS-Substitution Ser863Gly im DNA-Pol-Gen, da diese bis auf zwei Ausnahmen bei allen Vertretern dieser Gruppe zu finden war. Bei den VZV-Stämmen des Genotyps 1 fehlt diese Substitution komplett, und in Stämmen des Genotyps 3 konnte sie nur sehr selten gefunden werden. Damit zeigt das AS-Profil der DNA-Pol des Genotyps 5 einen signifikanten Unterschied zu dem der Genotypen 1 und 3. Um den Genotyp des VZV genau abzuklären, ist eine Charakterisierung des DNA-Pol-Gens jedoch nicht ausreichend. Dazu wurden in der Literatur zuverlässige Methoden wie z.B. die „scattered single-nucleotide polymorphism“-Methode auf der Basis der ORF 1, 21, 22, 37, 50, 54 und 60 beschrieben (Sauerbrei et al. 2011).

6.2 Klinisch resistente Varicella-Zoster-Virusstämme

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden zehn klinisch resistente VZV-Stämme auf das Vorhandensein einer Resistenz gegen Virostatika untersucht. Von diesen konnten aber lediglich zwei phänotypisch getestet werden, da bei den restlichen acht die Isolierung in einer Zellkultur nicht gelang und deshalb nur DNA als Untersuchungsmaterial zur Verfügung stand. Bei einem Isolat (1704/04) konnte der Verdacht auf eine bestehende ACV-Resistenz bestätigt werden, da die 50%igen Hemmkonzentrationen von ACV, PCV und BVDU weit über dem Vierfachen des Referenzwertes lagen. Bei der genotypischen Analyse des TK-Gens dieses VZV-Stamms wurde festgestellt, dass eine Mischung aus mutierten und nicht-mutierten Virusstämmen vorlag. Mit hoher Wahrscheinlichkeit wurde die ACV-Resistenz

durch die AS-Substitution Trp225Arg verursacht. Im Gegensatz dazu müsste der nicht veränderte Virusstamm ACV-sensitiv sein. Ein ähnlicher Fall, in dem solch ein Mix aus einem resistenten und einem sensitiven Virusstamm, bei dem nur natürliche Polymorphismen nachweisbar waren, vorliegt, wurde von Sawyer et al. (1988) berichtet. Dort wird postuliert, dass sich in Anwesenheit von ACV, d.h. unter dem Selektionsdruck des Virostatikums, die resistente Subpopulation durchsetzt. Diese Aussage kann mit dem Ergebnis der phänotypischen Resistenzbestimmung in dieser Studie bestätigt werden. Ein gleichzeitiges Vorhandensein von zwei VZV-Stämmen, die unterschiedlich auf ACV reagieren, könnte die Resistenzbestimmung erschweren. Vor allem mit den phänotypischen Methoden könnten nicht korrekte Ergebnisse geliefert werden, da unklar ist, ob sich der sensitive oder der resistente Virusstamm während der Virusisolation ohne Zugabe von ACV durchsetzt. Dem zufolge könnten betroffene Patienten falsch therapiert werden, wenn phänotypisch eine ACV-Sensitivität diagnostiziert wird, tatsächlich aber eine Resistenz vorliegt. Studien haben belegt, dass der Plaquereduktionstest eine äußerst zuverlässige Methode zur Bestimmung der phänotypischen Resistenz darstellt, auch wenn die große Mehrzahl der Viruspopulationen sensitiv ist. Eine Resistenz des HSV konnte noch belegt werden, wenn mindestens 20% der Viruspopulationen resistent waren (Bacon et al. 2003).

Für den VZV-Stamm 3532/09 ergab sich phänotypisch eine Sensitivität gegenüber allen getesteten antiviralen Substanzen. Dieses Ergebnis korreliert mit der genotypischen Analyse. Im TK-Gen konnten keine Genomveränderungen festgestellt werden, die auf eine ACV-Resistenz hinweisen. Das DNA-Pol-Gen enthielt nur eine AS-Substitution Ser863Gly, welche aber bereits durch Visse et al. (1998) dem natürlichen Genpolymorphismus zugeordnet wurde. Des Weiteren wurden zwei Nt-Substitutionen gefunden, von denen aber weder G288A noch T1632C zu einer abweichenden AS-Sequenz führen.

In allen zehn klinisch-resistenten VZV-Stämmen konnte wie bei den sensitiven Stämmen im TK-Gen die bekannte AS-Substitution Ser288Leu nachgewiesen werden, welche keinen Einfluss auf die ACV-Empfindlichkeit nimmt. Insgesamt wurden in fünf dieser VZV-Stämme mit hoher Wahrscheinlichkeit Resistenz-assoziierte Mutationen im TK-Gen lokalisiert (Leu73Ile, Trp225Arg, Thr256Met, Gln303Stopp und Asn334Stopp), welche bis auf Thr256Met und Gln303Stopp bislang noch nicht in der Literatur beschrieben wurden. Die Bedeutung von Trp225Arg wurde bereits oben beschrieben und durch den Resistenzphänotyp belegt. Eine ähnliche bekannte Mutation, die ebenfalls die AS 225 betrifft und in der Literatur beschrieben wurde, verursacht ebenfalls eine ACV-Resistenz. Allerdings resultiert diese aus einem entstehenden Stopp-Codon, welches eine Verkürzung des Proteins zur Folge hat

(Sawyer et al. 1988). Zwei weitere AS-Substitutionen Thr256Met und Asn334Stopp stehen mit hoher Wahrscheinlichkeit im Zusammenhang mit einer ACV-Resistenz, auch wenn in dieser Studie das phänotypische Korrelat dazu fehlt. Der VZV-Stamm, welcher Thr256Met enthält (0679/09), besitzt keine weiteren genetischen Abweichungen, weder im TK- noch im DNA-Pol-Gen. Außerdem befindet sich diese Substitution in einer konservierten Genregion. Phänotypisch konnte die ACV-Resistenz, welche durch Thr256Met verursacht wird, in einer anderen Studie bestätigt werden (Bleymehl et al. 2011). Aus diesem Grunde kann diese Substitution als Ursache der Resistenz angesehen werden. Der VZV-Stamm 0940/09 enthielt neben Asn334Stopp zusätzlich die AS-Substitution Lys103Gln. Auch hier konnte kein IC_{50} -Wert ermittelt werden. Da jedoch höchstwahrscheinlich die Frameshift-Mutation für die Resistenz verantwortlich ist, ist Lys103Gln vermutlich Teil des natürlichen Genpolymorphismus. Die Wahrscheinlichkeit, dass die AS-Veränderung Leu73Ile eine ACV-Resistenz verursacht, ist hoch, konnte aber nicht zweifelsfrei belegt werden. Denn auch hier war die Möglichkeit einer phänotypischen Resistenzbestimmung nicht gegeben. Um diese Substitution als Ursache der ACV-Resistenz zweifelsfrei bestätigen zu können, wären weitere Untersuchungen mittels Site-directed Mutagenesis oder Klonierungsexperimenten erforderlich. Die AS-Substitution Gln303Stopp, deren Resistenz-Assoziation unzweifelhaft ist, wurde bereits in persistierenden Zoster-Stämmen von zwei AIDS-Patienten gefunden, welche unter ACV-Therapie nachgewiesen wurden (Fillet et al. 1998, Saint-Léger et al. 2001).

Im DNA-Pol-Gen zweier VZV-Stämme wurden Nt-Veränderungen gefunden, welche zu einer AS-Substitution führen. Aus C710A im Stamm 1049/09 resultierte der AS-Austausch Thr237Lys. Da diese Genomabweichung die einzige ist, welche bei diesem Virusstamm gefunden werden konnte, kann sie höchstwahrscheinlich als Ursache der ACV-Resistenz angesehen werden. Eine vollständige Sicherheit kann allerdings nicht gegeben werden, da die phänotypische Resistenzbestimmung nicht durchgeführt werden konnte und in der Literatur bisher auch nicht über diese Mutation berichtet wurde. Ähnlich verhält es sich mit der AS-Substitution Ala955Thr, welche aus dem Nt-Austausch G2863A im VZV-Stamm 0757/08 entstand. Sie befindet sich in der konservierten Region V des DNA-Pol-Gens und könnte daher eine wesentliche Rolle in der Resistenzentwicklung spielen. Allerdings enthält dieser Stamm auch die bereits beschriebene AS-Substitution Gln303Stopp im TK-Gen, welche mit hoher Sicherheit zu einer ACV-Resistenz führt. Es ist deshalb unklar, ob Ala955Thr für die Resistenz mitverantwortlich ist oder nicht. Um dies zu entscheiden, müsste ein Virusisolat vorliegen, das nur diese Mutation enthält und bei dem die phänotypische Untersuchung zum

Vergleich möglich wäre. Eine alternative Abklärung dieser Mutation wäre ebenfalls durch Site-directed Mutagenesis oder Klonierungsexperimente möglich.

Die beschriebenen Ergebnisse demonstrieren, dass insgesamt nur bei sechs der zehn Patienten, die unter ACV-Therapie für mindestens zehn Tage eine klinische Resistenz zeigten, mit Hilfe virologischer Methoden eine Resistenz bestätigt werden konnte. Das könnte daran liegen, dass evtl. nicht bei allen eine wirkliche ACV-Resistenz vorlag, da es verschiedene Definitionen für eine klinische Resistenz gibt. Zum einen kann bereits bei einem Fortbestehen der Hautläsionen nach zehntägiger ACV-Behandlung von einer klinischen Resistenz gesprochen werden (Safrin et al. 1991). Zum anderen wird sie erst, wenn bis zum 21. Behandlungstag keine Besserung der Symptome aufgetreten ist, als solche definiert (Saint-Léger et al. 2001). Außerdem berichten Boivin et al. (1994) von einer durchschnittlichen Entwicklungszeit einer ACV-Resistenz von 7,5 Wochen bei vier AIDS-Patienten. Somit ist das Ergebnis einer Resistenzbestimmung stark davon abhängig, ab wann der behandelnde Arzt eines Patienten mit einer VZV-Infektion von einer klinischen ACV-Resistenz ausgeht. Bei der Hälfte der zehn klinisch resistenten VZV-Stämme dieser Studie stand das Auftreten der ACV-Resistenz mit einer Immunsuppression in Verbindung. Aber nur bei zwei dieser immunsupprimierten Patienten konnte tatsächlich eine Resistenz-assoziierte Mutation gefunden werden. Es scheint deshalb wahrscheinlich, dass ein eingeschränktes Immunsystem die Behandlung einer VZV-Infektion erschweren kann, ohne dass eine Resistenz vorliegt und somit schneller zu einem Verdacht auf eine klinische Resistenz führt. Bereits Saint-Léger et al. (2001) stellten fest, dass eine beeinträchtigte zelluläre Immunität ein entscheidender Faktor für die Entwicklung einer ACV-Resistenz zu sein scheint. Sie postulierten, dass persistierende VZV-assoziierte Hautläsionen bis zum zehnten Behandlungstag bei immunsupprimierten Patienten lediglich ein Zeichen dafür sind, dass die Therapie verlängert werden muss. Dies kann mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit teilweise bestätigt werden. Außerdem ist ein rechtzeitiger Therapiebeginn für eine erfolgreiche Behandlung des HZ entscheidend. Dafür sollte innerhalb der ersten 72 Stunden nach Auftreten der ersten Symptome mit der antiviralen Medikation begonnen werden (Mustafa et al. 2009). Es liegen jedoch keine Daten vor, wann bei den Patienten, deren Untersuchungsmaterial in dieser Arbeit getestet wurde, die Therapie in Relation zum Beginn der Symptomatik begonnen wurde. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein verminderter oder ausbleibender Behandlungserfolg aus einem verspäteten Beginn resultierte. Dies könnte mit dazu beigetragen haben, dass bei vier VZV-Isolaten eine ACV-Resistenz vermutet wurde, aber keine Mutation gefunden werden konnte, die diesen Verdacht bestätigt. Des Weiteren ist fraglich, ob während der Behandlung

einer VZV-Infektion immer die korrekte Dosierung eingehalten wurde. Denn auch dies könnte ein Grund dafür sein, dass sich ein Therapieeffekt nicht rechtzeitig eingestellt hat und der Verdacht auf eine ACV-Resistenz entstanden ist. Empfohlen werden im Rahmen einer oralen ACV-Therapie täglich fünfmal 800 mg über sieben Tage. Dabei spielt die Compliance des jeweiligen Patienten eine große Rolle, damit eine ausreichende Dosis regelmäßig eingenommen wird. Optimaler ist daher eine i.v.-Therapie mit dreimal täglich 10 bis 15 mg/kg KG für sieben bis zwanzig Tage.

Zusammenfassend können verschiedene Faktoren benannt werden, die eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung einer ACV-Resistenz des VZV spielen. Zum einen kann es zur spontanen Entstehung neuer Resistenz-assoziiierter Mutationen kommen, welche während einer antiviralen Therapie selektiert werden. Dabei konnten bislang vorwiegend einzelne AS-Substitutionen oder verfrühte Stopp-Codons beobachtet werden. Zum anderen ist ein geschwächtes Immunsystem mit dafür verantwortlich, dass es zu einer gestörten Elimination resistenter Viren kommt. Erst im Zusammenspiel beider Faktoren entstehen höchstwahrscheinlich klinische Konsequenzen.

6.3 Methoden der phänotypischen Resistenzbestimmung

Eine Resistenzbestimmung sollte erfolgen, wenn während der Behandlung einer VZV-Infektion der klinische Verdacht auf eine ACV-Resistenz vorliegt. Dies ist meist der Fall, wenn sich nach zehn Tagen noch kein Therapieerfolg eingestellt hat. Die Resistenztestung kann entweder phäno- oder genotypisch erfolgen, wobei sich die phänotypische Untersuchung mittels des Plaquereduktionstests als Methode der Wahl herausgestellt hat. Da die Handhabung der phänotypischen Resistenztestung schwierig ist, wird viel Erfahrung benötigt, um sie korrekt durchführen zu können. Außerdem setzt sie die Anzucht des VZV voraus, was die Methode zeitaufwendig macht. Bis zum Auftreten der ersten cpEs vergehen mindestens zwei bis drei Tage (Sauerbrei et al. 2002). Des Weiteren ist die Sensitivität der VZV-Isolation aus Bläscheninhalt in Zellkulturen mit 20 bis 43% relativ gering (Sauerbrei et al. 1999, Beards et al. 1998). Das liegt zum einen daran, dass das VZV zellständig und instabil ist. Zum anderen ist nur eine geringe Auswahl von Zellkulturen vorhanden, die zur Isolation des Virus genutzt werden können, weil Fibroblasten oder primäre Epithelzellen verwendet werden sollten, die vom Mensch oder Affen stammen. Da für die Anzucht des VZV aus Patientenmaterial viel Zeit benötigt wird, ist die Durchführung des Plaquereduktionstests meist erst nach ein bis zwei Wochen möglich, wenn der Virustiter hoch

genug ist. Dadurch kann der Plaquereduktionstest zur phänotypischen Resistenztestung des VZV erst innerhalb von zwei bis drei Wochen ein Ergebnis liefern. Wie die genannte Sensitivität der Anzucht des VZV in der Zellkultur zeigt, kommt es in den meisten Fällen vor, dass die phänotypische Resistenzbestimmung nicht durchführbar ist. Während der Durchführung des Plaquereduktionstests war auffällig, dass die Ergebnisse des als Kontrolle mitgeführten Referenzstammes *vOka* starke Schwankungen aufwiesen. Für ACV variierten die IC_{50} -Werte beispielsweise zwischen 0,3 und 1,07 $\mu\text{g/ml}$. Dies weist darauf hin, dass die Versuchsbedingungen und das Verhalten der Zellkulturen relativ großen Schwankungen unterlagen. Eine Ursache könnte die Verwendung von HELF verschiedener Passagen sein, da nicht immer Zellen der gleichen Passage zur Verfügung standen. Darüber hinaus könnten auch subjektive Faktoren bei der Testauswertung, wie z.B. das Auszählen der Plaques in den Kavitäten einer Zellkulturplatte, eine Rolle spielen.

Trotz der möglichen Schwierigkeiten, die während der phänotypischen Resistenztestung mittels des Plaquereduktionstests auftreten können, kann dieser Test als zuverlässig eingestuft werden (Bacon et al. 2003). Ein Beleg dafür ist, dass bei den einbezogenen ACV-sensitiven VZV-Isolaten die Ergebnisse der phänotypischen Testung gut mit den genotypischen Resultaten korrelierten. Zudem wurden auch die zwei klinisch resistenten VZV-Stämme, mit denen die phänotypische Resistenzbestimmung durchgeführt werden konnte, in Übereinstimmung mit den genotypischen Befunden getestet. Die Tatsache, dass selbst bei dem VZV-Stamm 1704/04, welcher sowohl resistente als auch sensitive Viren enthielt, die resistente Subpopulation phänotypisch detektiert wurde, ist ein Beleg für die Zuverlässigkeit dieses Tests. Wenn auch bezüglich des VZV nur relativ wenige Erfahrungen bis heute vorliegen, so hat sich der Plaquereduktionstest vor allem für die phänotypische Resistenztestung des HSV als Standardmethode etabliert. Allerdings besitzt das HSV den Vorteil, dass es weitaus besser in der Zellkultur isoliert werden kann (Bacon et al. 2003).

6.4 Methoden der genotypischen Resistenzbestimmung

Da das VZV nur sehr eingeschränkt kultivierbar ist, kommt der genotypischen Resistenzbestimmung durch die Sequenzierung des TK- und DNA-Pol-Gens eine große Bedeutung zu, um mögliche Ursachen einer ACV-Resistenz von VZV-Stämmen zu finden. Da 95% der Mutationen, welche eine ACV-Resistenz verursachen, im TK-Gen lokalisiert sind, ist es besonders wichtig, diesen Genomabschnitt zu analysieren. Die restlichen fünf Prozent basieren auf Veränderungen im DNA-Pol-Gen (Hatchette et al. 2008). Ein deutlicher

Vorteil der genotypischen Resistenzbestimmung gegenüber der phänotypischen ist, dass in den meisten Fällen bereits innerhalb von wenigen Tagen ein Ergebnis vorliegt und somit die antivirale Therapie des betroffenen Patienten schnell korrigiert bzw. angepasst werden kann. Allerdings wurden bis jetzt nur wenige nicht-synonyme Mutationen, welche eine Resistenz verursachen, in der Literatur beschrieben. Dadurch ist es nicht immer möglich, das Ergebnis der genotypischen Analyse richtig zu interpretieren. Wenn beispielsweise eine unbekannt Mutation auftritt und das phänotypische Korrelat fehlt, kann nicht mit absoluter Wahrscheinlichkeit entschieden werden, ob sie für eine ACV-Resistenz verantwortlich ist. Wenn Mutationen gefunden wurden, die in den konservierten Regionen der Gene lokalisiert waren, kann dies als relativ zuverlässiger Hinweis für eine Resistenz angesehen werden. Allerdings können in seltenen Fällen, wie auch die vorliegenden Untersuchungen gezeigt haben, Genpolymorphismen in konservierten Regionen lokalisiert sein. Als Korrelat zu den genotypischen Ergebnissen sollte immer, wenn möglich, ein phänotypischer Resistenztest durchgeführt werden. Sollte dies aufgrund eines fehlenden VZV-Isolats nicht möglich sein, stehen andere, wenn auch bedeutend aufwendigere Methoden zur Verifikation zur Verfügung. Mit Hilfe von Klonierungsexperimenten oder der Site-directed Mutagenesis können Belege für die Resistenzassoziationen der gefundenen Mutationen erbracht werden.

Für die vollständige Durchführung der Sequenzierung ist es wichtig, dass genug DNA vorhanden ist bzw. genügend Patientenmaterial vorliegt, aus dem die DNA isoliert werden kann. Bei gelungener Anzucht steht meist DNA in unbegrenzter Menge zur Verfügung. Wenn nicht genügend DNA vorhanden ist, kann es passieren, dass nicht beide Gene komplett analysiert werden können und Mutationen in den verbleibenden Abschnitten unentdeckt bleiben. Von Vorteil war in den eigenen Untersuchungen die Verwendung des High Fidelity PCR Enzyme Mix für die PCR des DNA-Pol-Gens. Zum einen waren nur sehr geringe Mengen DNA notwendig, zum anderen ist in diesem Enzymmix zusätzlich zur Taq-DNA-Polymerase eine thermostabile Pfu DNA-Polymerase enthalten, welche eine sogenannte „proofreading“-Aktivität besitzt. Dadurch ist es möglich, mit sehr großer Genauigkeit lange PCR-Produkte herzustellen und somit die Qualität der Amplifikate zu verbessern. Des Weiteren ist es sehr wichtig, geeignete Primer zu verwenden. Davon hängt unter anderem die Qualität der Teilsequenzen ab. Da diese anschließend am Computer ausgewertet werden müssen, sollten klare und gut lesbare Sequenzen angestrebt werden. Um daraus resultierende Fehlinterpretationen zu vermeiden, mussten im Verlauf der Sequenzierung der vorliegenden Arbeit einige Sequenzabschnitte wiederholt und mit verschiedenen Primern sequenziert werden. Dies war vor allem bei Anteilen des DNA-Pol-Gens notwendig. Führt ein Wechsel

des Primers nicht zum gewünschten Ziel, sollte die Zusammensetzung der Sequenzier-PCR-Ansätze mit verschiedenen DNA- oder Primermengen optimiert werden. Für die Auswertung der Sequenzen am Computer wird ein hohes Maß an Erfahrung benötigt, um die Sequenzen korrekt abzulesen und vorhandene Abweichungen zu erkennen und nicht zu übersehen.

Schlussfolgernd kann aus den vorliegenden Befunden formuliert werden, dass die genotypische Resistenzbestimmung für das VZV die Methode der Wahl darstellt, da die phänotypische Testung nur in begrenztem Maße möglich ist.

7. Schlussfolgerungen

1. Die derzeit zur Behandlung von Varicella-Zoster-Virus (VZV)-Erkrankungen zugelassenen antiviralen Substanzen sind Aciclovir (ACV), Valaciclovir, Penciclovir, Fanciclovir, Brivudin und Foscarnet.
2. Bisher gibt es nur wenige Erfahrungen im Bereich der VZV-Resistenztestung. Dies liegt zum großen Teil daran, dass ACV-Resistenzen bei VZV nur relativ selten beobachtet werden.
3. Von einer ACV-Resistenz sind vor allem immunsupprimierte Patienten betroffen, die einer lang andauernden ACV-Therapie unterliegen.
4. Bei immunsupprimierten Patienten unter ACV sprechen persistierende VZV-assoziierte Hautläsionen über den zehnten Behandlungstag hinaus für eine klinische Resistenz.
5. Die Anzucht von VZV-Stämmen aus Patientenmaterial ist schwierig und zeitaufwendig. Aus diesem Grunde ist eine phänotypische Resistenztestung in vielen Fällen nicht möglich.
6. Der Plaquereduktionstest ist eine zuverlässige Methode zur Bestimmung der phänotypischen Resistenz des VZV gegenüber antiviralen Chemotherapeutika.
7. Die genotypische Resistenzbestimmung ist für die Resistenztestung des VZV die Methode der Wahl, da sie innerhalb relativ kurzer Zeit eine Analyse des viralen Thymidinkinase (TK)- und DNA-Polymerase (DNA-Pol)-Gens erlaubt. Diese viralen Genregionen stellen die Targets derzeit verfügbarer Virostatika zur Behandlung von VZV-Infektionen dar.
8. Das Genom des VZV ist stärker konserviert als das des Herpes-simplex-Virus. Dadurch ist der Genpolymorphismus weniger ausgeprägt.
9. Durch die relativ geringe natürliche Genomvariabilität des VZV muss die Bedeutung neuer nicht-synonymer Mutationen für eine Resistenz stets abgeklärt werden. Ohne ein phänotypisches Korrelat kann in vielen Fällen nicht eindeutig entschieden werden, ob eine Mutation Resistenz-assoziiert ist oder nicht.

10. Für eine genotypische Resistenztestung ist die Sequenzierung des TK-Gens ausschlaggebend, da 95% aller Resistenz-assoziierten Mutationen im TK-Gen lokalisiert sind. Fünf Prozent solcher Mutationen sind im DNA-Pol-Gen lokalisiert.
11. Resistenz-assoziierte Mutationen entstehen meist unter dem Selektionsdruck eines Virostatikums, wobei klinische Konsequenzen höchstwahrscheinlich erst bei Störungen des Immunsystems resultieren.
12. Alle klinischen VZV-Stämme besitzen als natürlichen Genpolymorphismus die Aminosäure (AS)-Substitution Ser288Leu im TK-Gen.
13. Die im TK-Gen lokalisierten AS-Substitutionen Leu73Ile, Trp225Arg und Asn334Stopp sind mit hoher Wahrscheinlichkeit mit einer ACV-Resistenz assoziiert. Die Bedeutung der Substitutionen Thr256Met und Gln303Stopp für eine Resistenz ist in der Literatur belegt.
14. Im DNA-Pol-Gen des VZV-Genotyps 1 ist der natürliche Genpolymorphismus am geringsten ausgeprägt. Der VZV-Genotyp 2 zeigte im DNA-Pol-Gen einen deutlich stärkeren Polymorphismus als die anderen Genotypen.
15. Die AS-Substitutionen Met286Ile, Glu824Gln, Arg984His und His1089Tyr im DNA-Pol-Gen von klinischen VZV-Stämmen der Genotypen 3 und 5 wurden als Bestandteil des natürlichen Genpolymorphismus nachgewiesen. Dabei stellt die Polymorphismus-assoziierte AS-Substitution Ser863Gly im DNA-Pol-Gen ein charakteristisches Merkmal des VZV-Genotyps 5 dar.
16. Der AS-Austausch Thr237Lys im DNA-Pol-Gen kann mit hoher Wahrscheinlichkeit als Ursache einer ACV-Resistenz angesehen werden.

8. Literaturverzeichnis

- Amlie-Lefond C, Jubelt B. 2009. Neurologic manifestations of varicella zoster virus infections. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 9:430-434.
- Andrei G, De Clercq E, Snoeck R. 2004. In vitro selection of drug-resistant varicella-zoster virus (VZV) mutants (OKA strain): differences between acyclovir and penciclovir? *Antiviral Res*, 61:181-187.
- Arvin AM. 2002. Antiviral therapy for varicella and herpes zoster. *Semin Pediatr Infect Dis*, 13:12-21.
- Askalan R, Laughlin S, Mayank S, Chan A, MacGregor D, Andrew M, Curtis R, Meaney B, deVeber G. 2001. Chickenpox and stroke in childhood: a study of frequency and causation. *Stroke*, 32:1257-1262.
- Bacon TH, Levin MJ, Leary JJ, Sarisky RT, Sutton D. 2003. Herpes simplex virus resistance to acyclovir and penciclovir after two decades of antiviral therapy. *Clin Microbiol Rev*, 16:114-128.
- Balfour HH, Jr., Benson C, Braun J, Cassens B, Erice A, Friedman-Kien A, Klein T, Polsky B, Safrin S. 1994. Management of acyclovir-resistant herpes simplex and varicella-zoster virus infections. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 7:254-260.
- Beards G, Graham C, Pillay D. 1998. Investigation of vesicular rashes for HSV and VZV by PCR. *J Med Virol*, 54:155-157.
- Bezold GD, Lange ME, Gall H, Peter RU. 2001. Detection of cutaneous varicella zoster virus infections by immunofluorescence versus PCR. *Eur J Dermatol*, 11:108-111.
- Bird LE, Ren J, Wright A, Leslie KD, Degreve B, Balzarini J, Stammers DK. 2003. Crystal structure of varicella zoster virus thymidine kinase. *J Biol Chem*, 278:24680-24687.
- Biron KK, Fyfe JA, Noblin JE, Elion GB. 1982. Selection and preliminary characterization of acyclovir-resistant mutants of varicella zoster virus. *Am J Med*, 73:383-386.
- Bleymehl K, Cinatl J, Schmidt-Chanasit J. 2011. Phenotypic and genetic characterization of varicella-zoster virus mutants resistant to acyclovir, brivudine and/or foscarnet. *Med Microbiol Immunol*.
- Bohn K, Zell R, Schacke M, Wutzler P, Sauerbrei A. 2011. Gene polymorphism of thymidine kinase and DNA polymerase in clinical strains of herpes simplex virus. *Antiviral Therapy*, doi:103851/IMP1852.
- Boivin G, Edelman CK, Pedneault L, Talarico CL, Biron KK, Balfour HH, Jr. 1994. Phenotypic and genotypic characterization of acyclovir-resistant varicella-zoster viruses isolated from persons with AIDS. *J Infect Dis*, 170:68-75.
- Braun RW. 2002. Morphologie, Taxonomie, Replikation und Genetik. In: Doerr, HW, Gerlich, WH, *Medizinische Virologie*, 1. Auflage. Stuttgart, New York, Thieme:7-28.
- Breuer J, Whitley R. 2007. Varicella zoster virus: natural history and current therapies of varicella and herpes zoster. *Herpes*, 14 Suppl 2:25-29.
- Breuer J, Grose C, Norberg P, Tipples G, Schmid DS. 2010. A proposal for a common nomenclature for viral clades that form the species varicella-zoster virus: summary of VZV Nomenclature Meeting 2008, Barts and the London School of Medicine and Dentistry, 24-25 July 2008. *J Gen Virol*, 91:821-828.
- Brunell PA, Argaw T. 2000. Chickenpox attributable to a vaccine virus contracted from a vaccinee with zoster. *Pediatrics*, 106:E28.

- Burrell S, Deback C, Agut H, Boutolleau D. 2010. Genotypic characterization of UL23 thymidine kinase and UL30 DNA polymerase of clinical isolates of herpes simplex virus: natural polymorphism and mutations associated with resistance to antivirals. *Antimicrob Agents Chemother*, 54:4833-4842.
- Carroll WM, Mastaglia FL. 1979. Optic neuropathy and ophthalmoplegia in herpes zoster ophthalmicus. *Neurology*, 29:726-729.
- Chibo D, Druce J, Sasadeusz J, Birch C. 2004. Molecular analysis of clinical isolates of acyclovir resistant herpes simplex virus. *Antiviral Res*, 61:83-91.
- Chrisp P, Clissold SP. 1991. Foscarnet. A review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use in immunocompromised patients with cytomegalovirus retinitis. *Drugs*, 41:104-129.
- Cohrs RJ, Gilden DH. 2007. Prevalence and abundance of latently transcribed varicella-zoster virus genes in human ganglia. *J Virol*, 81:2950-2956.
- Daley AJ, Thorpe S, Garland SM. 2008. Varicella and the pregnant woman: prevention and management. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, 48:26-33.
- Davison AJ. 1984. Structure of the genome termini of varicella-zoster virus. *J Gen Virol*, 65:1969-1977.
- Davison AJ, Scott JE. 1986. The complete DNA sequence of varicella-zoster virus. *J Gen Virol*, 67:1759-1816.
- Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, Pellett PE, Roizman B, Studdert MJ, Thiry E. 2009. The order Herpesvirales. *Arch Virol*, 154:171-177.
- De Clercq E. 2001. Antiviral drugs: current state of the art. *J Clin Virol*, 22:73-89.
- De Clercq E. 2004. Antiviral drugs in current clinical use. *J Clin Virol*, 30:115-133.
- De Clercq E. 2005. (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine (BVDU). *Med Res Rev*, 25:1-20.
- Degreef H. 1994. Famciclovir, a new oral antiherpes drug: results of the first controlled clinical study demonstrating its efficacy and safety in the treatment of uncomplicated herpes zoster in immunocompetent patients. *Int J Antimicrob Agents*, 4:241-246.
- Dworkin RH, Schmader KE. 2003. Treatment and prevention of postherpetic neuralgia. *Clin Infect Dis*, 36:877-882.
- Färber I, Höger P, Hofmann F, Kreth H, Neiß A, Raue W, Schneeweiß B, Windorfer A, Wutzler P. 2005. *Ärztmerkblatt Varizellen/Zoster*.
- Fillet AM, Dumont B, Caumes E, Visse B, Agut H, Bricaire F, Huraux JM. 1998. Acyclovir-resistant varicella-zoster virus: phenotypic and genetic characterization. *J Med Virol*, 55:250-254.
- Focher F, Lossani A, Verri A, Spadari S, Maioli A, Gambino JJ, Wright GE, Eberle R, Black DH, Medveczky P, Medveczky M, Shugar D. 2007. Sensitivity of monkey B virus (Cercopithecine herpesvirus 1) to antiviral drugs: role of thymidine kinase in antiviral activities of substrate analogs and acyclonucleosides. *Antimicrob Agents Chemother*, 51:2028-2034.
- Gabler-Sandberger E. 2000. Varizella-Zoster-Virus: Windpocken nicht als harmlos einschätzen. *Deutsches Ärzteblatt*, 97: A-1012/ B-842/ C-787
- Gardella C, Brown ZA. 2007. Managing varicella zoster infection in pregnancy. *Cleve Clin J Med*, 74:290-296.

- Gary L, Gildeen DH, Cohrs RJ. 2006. Epigenetic regulation of varicella-zoster virus open reading frames 62 and 63 in latently infected human trigeminal ganglia. *J Virol*, 80:4921-4926.
- Gershon AA, Sherman DL, Zhu Z, Gabel CA, Ambron RT, Gershon MD. 1994. Intracellular transport of newly synthesized varicella-zoster virus: final envelopment in the trans-Golgi network. *J Virol*, 68:6372-6390.
- Guess HA, Broughton DD, Melton LJ, 3rd, Kurland LT. 1986. Population-based studies of varicella complications. *Pediatrics*, 78:723-727.
- Hasegawa T, Kurokawa M, Yukawa TA, Horii M, Shiraki K. 1995. Inhibitory action of acyclovir (ACV) and penciclovir (PCV) on plaque formation and partial cross-resistance of ACV-resistant varicella-zoster virus to PCV. *Antiviral Res*, 27:271-279.
- Hatchette T, Tipples GA, Peters G, Alsuwaidi A, Zhou J, Mailman TL. 2008. Foscarnet salvage therapy for acyclovir-resistant varicella zoster: report of a novel thymidine kinase mutation and review of the literature. *Pediatr Infect Dis J*, 27:75-77.
- Heuchan AM, Isaacs D. 2001. The management of varicella-zoster virus exposure and infection in pregnancy and the newborn period. Australasian Subgroup in Paediatric Infectious Diseases of the Australasian Society for Infectious Diseases. *Med J Aust*, 174:288-292.
- Huang YC, Lin TY, Lin YJ, Lien RI, Chou YH. 2001. Prophylaxis of intravenous immunoglobulin and acyclovir in perinatal varicella. *Eur J Pediatr*, 160:91-94.
- Ida M, Kageyama S, Sato H, Kamiyama T, Yamamura J, Kurokawa M, Morohashi M, Shiraki K. 1999. Emergence of resistance to acyclovir and penciclovir in varicella-zoster virus and genetic analysis of acyclovir-resistant variants. *Antiviral Res*, 40:155-166.
- Kamiyama T, Kurokawa M, Shiraki K. 2001. Characterization of the DNA polymerase gene of varicella-zoster viruses resistant to acyclovir. *J Gen Virol*, 82:2761-2765.
- Kinchington PR, Reinhold WC, Casey TA, Straus SE, Hay J, Ruyechan WT. 1985. Inversion and circularization of the varicella-zoster virus genome. *J Virol*, 56:194-200.
- Kost RG, Straus SE. 1996. Postherpetic neuralgia--pathogenesis, treatment, and prevention. *N Engl J Med*, 335:32-42.
- Leppard B, Naburi AE. 1998. Herpes zoster: an early manifestation of HIV infection. *Afr Health*, 21:5-6.
- Loparev VN, Rubtcova EN, Bostik V, Govil D, Birch CJ, Druce JD, Schmid DS, Croxson MC. 2007. Identification of five major and two minor genotypes of varicella-zoster virus strains: a practical two-amplicon approach used to genotype clinical isolates in Australia and New Zealand. *J Virol*, 81:12758-12765.
- Lüllmann H, Mohr K, Hein L. 2006. Viruserkrankungen. In: *Pharmakologie und Toxikologie*, 16., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart, New York, Thieme, 481-491.
- McCrary ML, Severson J, Tyring SK. 1999. Varicella zoster virus. *J Am Acad Dermatol*, 41:1-14; quiz 15-16.
- McGuigan C, Balzarini J. 2009. FV100 as a new approach for the possible treatment of varicella-zoster virus infection. *J Antimicrob Chemother*, 64:671-673.
- Megged O, Schlesinger Y. 2009. Varicella zoster infection in adults: a preventable disease. *Isr Med Assoc J*, 11:306-307.
- Meier JL, Straus SE. 1993. Varicella-zoster virus DNA polymerase and major DNA-binding protein genes have overlapping divergent promoters. *J Virol*, 67:7573-7581.

- Morfin F, Thouvenot D, De Turenne-Tessier M, Lina B, Aymard M, Ooka T. 1999. Phenotypic and genetic characterization of thymidine kinase from clinical strains of varicella-zoster virus resistant to acyclovir. *Antimicrob Agents Chemother*, 43:2412-2416.
- Mueller NH, Gilden DH, Cohrs RJ, Mahalingam R, Nagel MA. 2008. Varicella zoster virus infection: clinical features, molecular pathogenesis of disease, and latency. *Neurol Clin*, 26:675-697, viii.
- Mustafa MB, Arduino PG, Porter SR. 2009. Varicella zoster virus: review of its management. *J Oral Pathol Med*, 38:673-688.
- Opstelten W, Eekhof J, Neven AK, Verheij T. 2008. Treatment of herpes zoster. *Can Fam Physician*, 54:373-377.
- Oxman MN. 2009. Herpes zoster pathogenesis and cell-mediated immunity and immunosenescence. *J Am Osteopath Assoc*, 109:S13-17.
- Puchhammer-Stöckl E, Popow-Kraupp T, Heinz FX, Mandl CW, Kunz C. 1991. Detection of varicella-zoster virus DNA by polymerase chain reaction in the cerebrospinal fluid of patients suffering from neurological complications associated with chicken pox or herpes zoster. *J Clin Microbiol*, 29:1513-1516.
- Quinlivan M, Breuer J. 2005. Molecular and therapeutic aspects of varicella-zoster virus infection. *Expert Rev Mol Med*, 7:1-24.
- Rahaus M, Schunemann S, Wolff MH. 1999. Morphological and biological characteristics of varicella-zoster virus. *Contrib Microbiol*, 3:1-9.
- Rowbotham M, Harden N, Stacey B, Bernstein P, Magnus-Miller L. 1998. Gabapentin for the treatment of postherpetic neuralgia: a randomized controlled trial. *JAMA*, 280:1837-1842.
- Sadzot-Delvaux C, Baudoux L, Defechereux P, Piette J, Rentier B. 1999. Overview of the replication cycle of varicella-zoster virus. *Contrib Microbiol*, 3:21-42.
- Safrin S, Berger TG, Gilson I, Wolfe PR, Wofsy CB, Mills J, Biron KK. 1991. Foscarnet therapy in five patients with AIDS and acyclovir-resistant varicella-zoster virus infection. *Ann Intern Med*, 115:19-21.
- Saint-Léger E, Caumes E, Breton G, Douard D, Saiag P, Huraux JM, Bricaire F, Agut H, Fillet AM. 2001. Clinical and virologic characterization of acyclovir-resistant varicella-zoster viruses isolated from 11 patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Infect Dis*, 33:2061-2067.
- Sauerbrei A. 2006. Kostenersparnis in Millionenhöhe durch flächendeckende Impfung. *pädiatrie hautnah*, S2:13-15.
- Sauerbrei A, Wutzler P. 2000. The congenital varicella syndrome. *J Perinatol*, 20:548-554.
- Sauerbrei A, Wutzler P. 2001. Neonatal varicella. *J Perinatol*, 21:545-549.
- Sauerbrei A, Wutzler P. 2004a. Labordiagnostik der Varizellen. *Kinderärztliche Praxis*, Sonderheft "Impfen":18-21.
- Sauerbrei A, Wutzler P. 2004b. *Varicella- Zoster- Virus- Infektionen: Aktuelle Prophylaxe und Therapie*. UNI-MED- Verlag AG, 1. Auflage.
- Sauerbrei A, Wutzler P. 2005. Varicella-Zoster Virus Infection During Pregnancy: Epidemiology, Clinical Symptoms, Diagnosis, Prevention and Therapy. *Current Pediatric Reviews*, 1:205-216.
- Sauerbrei A, Sommer M, Wutzler P. 1999. Virologic diagnosis of herpes zoster. *Hautarzt*, 50:873-878.

- Sauerbrei A, Uebe B, Wutzler P. 2003a. Molecular diagnosis of zoster post varicella vaccination. *J Clin Virol*, 27:190-199.
- Sauerbrei A, Sommer M, Eichhorn U, Wutzler P. 2002. Laboratory diagnosis of herpes zoster: virology or serology? *Med Klin (Munich)*, 97:123-127.
- Sauerbrei A, Zell R, Philipps A, Wutzler P. 2008. Genotypes of varicella-zoster virus wild-type strains in Germany. *J Med Virol*, 80:1123-1130.
- Sauerbrei A, Deinhardt S, Zell R, Wutzler P. 2010. Phenotypic and genotypic characterization of acyclovir-resistant clinical isolates of herpes simplex virus. *Antiviral Res*, 86:246-252.
- Sauerbrei A, Farber I, Brandstadt A, Schacke M, Wutzler P. 2004. Immunofluorescence test for sensitive detection of varicella-zoster virus-specific IgG: an alternative to fluorescent antibody to membrane antigen test. *J Virol Methods*, 119:25-30.
- Sauerbrei A, Eichhorn U, Gawellek S, Egerer R, Schacke M, Wutzler P. 2003b. Molecular characterisation of varicella-zoster virus strains in Germany and differentiation from the Oka vaccine strain. *J Med Virol*, 71:313-319.
- Sauerbrei A, Stefanski J, Philipps A, Krumbholz A, Zell R, Wutzler P. 2011. Monitoring prevalence of varicella-zoster virus clades in Germany. *Med Microbiol Immunol*.
- Sawyer MH, Inchauspe G, Biron KK, Waters DJ, Straus SE, Ostrove JM. 1988. Molecular analysis of the pyrimidine deoxyribonucleoside kinase gene of wild-type and acyclovir-resistant strains of varicella-zoster virus. *J Gen Virol*, 69:2585-2593.
- Schencking M, Sandholzer H, Frese T. 2010. Intravenous administration of vitamin C in the treatment of herpetic neuralgia: two case reports. *Med Sci Monit*, 16:CS58-61.
- Shigeta S, Yokota T, Iwabuchi T, Baba M, Konno K, Ogata M, De Clercq E. 1983. Comparative efficacy of antiherpes drugs against various strains of varicella-zoster virus. *J Infect Dis*, 147:576-584.
- Sitzmann FC. 2007. Pädiatrie. 3 Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Snoeck R, Andrei G, De Clercq E. 2000. Novel agents for the therapy of varicella-zoster virus infections. *Expert Opin Investig Drugs*, 9:1743-1751.
- STIKO. 2010. RKI: Empfehlungen der Ständigen Impfkommission Berlin. *Epid Bull* 30:280-297.
- Suzutani T, Lacey SF, Powell KL, Purifoy DJ, Honess RW. 1992. Random mutagenesis of the thymidine kinase gene of varicella-zoster virus. *J Virol*, 66:2118-2124.
- Sweeney CJ, Gilden DH. 2001. Ramsay Hunt syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 71:149-154.
- Takahashi M, Otsuka T, Okuno Y, Asano Y, Yazaki T. 1974. Live vaccine used to prevent the spread of varicella in children in hospital. *Lancet*, 2:1288-1290.
- Talarico CL, Phelps WC, Biron KK. 1993. Analysis of the thymidine kinase genes from acyclovir-resistant mutants of varicella-zoster virus isolated from patients with AIDS. *J Virol*, 67:1024-1033.
- Tunbridge AJ, Breuer J, Jeffery KJ. 2008. Chickenpox in adults - clinical management. *J Infect*, 57:95-102.
- Tyler SD, Peters GA, Grose C, Severini A, Gray MJ, Upton C, Tipples GA. 2007. Genomic cartography of varicella-zoster virus: a complete genome-based analysis of strain variability with implications for attenuation and phenotypic differences. *Virology*, 359:447-458.

- Tyring SK, Diaz-Mitoma F, Padget LG, Nunez M, Poland G, Cassidy WM, Bundick ND, Li J, Chan IS, Stek JE, Annunziato PW. 2007. Safety and tolerability of a high-potency zoster vaccine in adults \geq 50 or years of age. *Vaccine*, 25:1877-1883.
- Vazquez M, LaRussa PS, Gershon AA, Steinberg SP, Freudigman K, Shapiro ED. 2001. The effectiveness of the varicella vaccine in clinical practice. *N Engl J Med*, 344:955-960.
- Visse B, Huraux JM, Fillet AM. 1999. Point mutations in the varicella-zoster virus DNA polymerase gene confers resistance to foscarnet and slow growth phenotype. *J Med Virol*, 59:84-90.
- Visse B, Dumont B, Huraux JM, Fillet AM. 1998. Single amino acid change in DNA polymerase is associated with foscarnet resistance in a varicella-zoster virus strain recovered from a patient with AIDS. *J Infect Dis*, 178 Suppl 1:S55-57.
- Weaver BA. 2009. Herpes zoster overview: natural history and incidence. *J Am Osteopath Assoc*, 109:S2-6.
- Weller S, Blum MR, Doucette M, Burnette T, Cederberg DM, de Miranda P, Smiley ML. 1993. Pharmacokinetics of the acyclovir pro-drug valaciclovir after escalating single- and multiple-dose administration to normal volunteers. *Clin Pharmacol Ther*, 54:595-605.
- Whitley RJ, Gnann JW. 1999. Herpes zoster: focus on treatment in older adults. *Antiviral Res*, 44:145-154.
- Whitley RJ, Weiss H, Gnann JW, Jr., Tyring S, Mertz GJ, Pappas PG, Schlepner CJ, Hayden F, Wolf J, Soong SJ. 1996. Acyclovir with and without prednisone for the treatment of herpes zoster. A randomized, placebo-controlled trial. The National Institute of Allergy and Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group. *Ann Intern Med*, 125:376-383.
- Wieland U. 2005. Virusinfektionen von Haut und Schleimhaut. Institut für Virologie des Klinikums der Universität zu Köln.
- Wutzler P, Sauerbrei A. 2007. Varizellen in der Schwangerschaft und bei Neugeborenen. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 50:237-244.
- Wutzler P, Sauerbrei A. 2010. Herpes-Simplex-Virus, Varicella-Zoster-Virus. In: Doerr, HW, Gerlich WH, *Medizinische Virologie*, 2., komplett überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart, New York, Thieme.658-665.
- Wutzler P, Neiß A, Banz K, Tischer A. 2002. Ist eine Elimination der Varizellen durch eine allgemeine Impfung möglich? *Deutsches Ärzteblatt*, Heft 15.
- Wutzler P, Färber I, Wagenpfeil S, Bisanz H, Tischer A. 2001. Seroprevalence of varicella-zoster virus in the German population. *Vaccine*, 20:121-124.

9. Anhang

9.1 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Johanna Taut
 Geburtsdatum: 21.06.1988
 Geburtsort: Leipzig
 Familienstand: ledig

Schulbildung

Grundschule: 1994-1998 36. Grundschule, Leipzig
 Gymnasium: 1998-2005 Friedrich-List Gymnasium, Leipzig
 2005-2006 Friedrich-Schiller-Gymnasium, Leipzig
 Abschluss: 2006 Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung

Studium: 2007-2009 Humanmedizin an der Semmelweis-Universität,
 Budapest
 seit 2009 Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität,
 Jena
 Abschluss voraussichtlich 2014
 Famulaturen: März 2011 Innere Medizin, Heliosklinik, Schkeuditz
 August 2011 Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Klinikum St.
 Georg, Leipzig

Tätigkeiten

2006-2007 geringfügige Beschäftigung in einer Praxis für Allgemein-
 medizin, Leipzig
 2009-2010 Studentische Hilfskraft am Institut für Virologie und Antivirale
 Therapie, Universitätsklinikum Jena

9.2 Danksagung

Zum Abschluss möchte ich mich ausdrücklich bei allen bedanken, die mir während der gesamten Promotionszeit zur Seite standen und mich somit zum Abschluss dieser Arbeit befähigten.

Herrn Prof. Dr. med. habil. P. Wutzler danke ich, dass er mir die Durchführung des praktischen Anteils meiner Arbeit im Institut für Virologie und Antivirale Therapie der Universität Jena ermöglichte.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. habil. A. Sauerbrei. Er stellte mir das Thema dieser Arbeit und alle nötigen Materialien zur Verfügung und ermöglichte mir somit erste Erfahrungen im Bereich der experimentellen Forschung, die mein Leben bereicherten. Außerdem war er jederzeit erreichbar, um mich mit fachlicher Beratung zu unterstützen. Besonders beim Verfassen dieser Promotionschrift war er mir eine sehr große Hilfe.

Weiterhin möchte ich bei folgenden Mitarbeitern des Instituts bedanken. Herrn Dr. rer. nat. Dipl.-Biol. M. Schacke für die zur Verfügung gestellten Zellkulturen, Herrn Dr. rer. nat. E. Birch-Hirschfeld für die Herstellung der Oligonukleotid-Primer und bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. R. Zell für die Hilfe bei der genotypischen Sequenzauswertung.

Großartige Unterstützung erhielt ich auch durch Frau Dipl.-Biol. K. Bohn, Frau C. Rothmann, Frau M. Alexi und Frau M. Müller. Sie halfen mir, mich in die neue Materie der experimentellen Forschung einzuarbeiten, mir die nötigen Methoden anzueignen und auftretende Probleme zu lösen.

Zuletzt möchte ich auch meiner Familie und meinem Freund einen ganz besonderen Dank aussprechen. Nur durch ihre Unterstützung, Motivation und ihr Vertrauen in mich in allen Lebenslagen ist es mir möglich, das Medizinstudium zu absolvieren und mein Leben so zu gestalten, wie ich es mir wünsche.

9.3 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Johanna Taut,

dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. med. A. Sauerbrei, Prof. Dr. rer. nat. R. Zell, Dr. rer. nat. E. Birch-Hirschfeld, Dipl.-Biol. K. Bohn, C. Rothmann, M. Alexi, M. Müller,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.