

**Anwendung der LightCycler-Technologie
zur quantitativen Bestimmung viraler DNA
bei immunsupprimierten Patienten**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med)

Vorgelegt dem Rat der medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Oliver Scheck

geboren am 17. Mai 1977 in Karlsruhe

Gutachter:

1. _____

2. _____

3. _____

Zeitpunkt der öffentlichen Verteidigung: 06.11.2006

Teile der in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse wurden im Rahmen der wissenschaftlichen Tagung ConVir 2002 am 10. 5. 2002 vorgetragen.

Abkürzungen

| | |
|-----------|--|
| AdV | Adenovirus |
| Abb. | Abbildung |
| bp | Basenpaare |
| BSA | bovines Serumalbumin |
| CMV | Cytomegalievirus |
| d.h. | das heißt |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| EBV | Eppstein-Barr-Virus |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| FKS | fetales Kälberserum |
| FRET | <i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i> |
| Geq | Genomäquivalente |
| GvH | <i>Graft versus Host</i> |
| hAdV | humanes Adenovirus |
| HIV | humanes Immundefizienz Virus |
| HLA | <i>human leukocyte antigen</i> |
| ICTV | International Committee on Taxonomy of Viruses |
| kD | Kilodalton |
| KMT | Knochenmarktransplantation |
| LC | LightCycler TM -Instrument |
| μ | Mikro |
| m | milli |
| M | molar |
| NK-Zellen | natürliche Killerzellen |
| nm | Nanometer |
| NTP | Nukleosidtriphosphat |
| OD | Optische Dichte |
| PC | <i>personal Computer</i> |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RSV | <i>Respiratory Syncytial Virus</i> |
| SZT | Stammzelltransplantation |
| VZV | Varizella Zoster Virus |
| z.B. | zum Beispiel |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 4 |
| 1.1 | Infektionen nach allogener Stammzelltransplantation | 5 |
| 1.1.1 | Virale Infektionen in den Phasen nach Stammzelltransplantation | 5 |
| 1.1.2 | Adenovirusinfektionen | 7 |
| 1.1.3 | Cytomegalievirusinfektionen | 11 |
| 1.1.4 | Infektionen mit Parvovirus B19 | 14 |
| 1.2 | LightCycler-Technologie | 16 |
| 1.2.1 | Fluoreszenz-emittierende Systeme zum Echtzeit-PCR-Monitoring | 17 |
| 1.2.2 | Quantitative Bestimmung der DNA-Menge im LightCycler | 18 |
| 1.2.3 | Schmelzpunktanalyse | 19 |
| 2 | Ziele der Arbeit | 21 |
| 3 | Material und Methoden | 23 |
| 3.1 | Material | 23 |
| 3.1.1 | Biologische Materialien | 23 |
| 3.1.2 | Geräte und Hilfsmittel | 24 |
| 3.1.3 | Chemikalien, Marker, Enzyme, Kitsysteme | 26 |
| 3.2 | Methoden | 29 |
| 3.2.1 | Allgemeine molekularbiologische Methoden | 29 |
| 3.2.2 | Plasmidkonstruktion | 33 |
| 3.2.3 | pp65-Antigenämietest | 36 |
| 3.2.4 | Quantitative DNA-Bestimmung im LightCycler | 38 |
| 4 | Ergebnisse | 43 |
| 4.1 | Vorbereitung der <i>LightCycler</i> -Technologie für die Virusdiagnostik | 43 |
| 4.1.1 | Herstellung von Referenz-DNA | 43 |
| 4.1.2 | Auswahl der Sonden und Primer | 49 |
| 4.1.3 | Verwendung der Referenz-DNA zur Herstellung von Standardkurven | 57 |
| 4.2 | Anwendung der LightCycler-Technologie zum Nachweis von humanen Adenoviren | 61 |
| 4.2.1 | Reproduzierbarkeit der Adenovirus-PCR im LightCycler | 61 |
| 4.2.2 | Patientenproben | 62 |
| 4.2.3 | Patientenverläufe | 64 |
| 4.3 | Anwendung der <i>LightCycler</i> -Technologie zum Nachweis von Cytomegalievirusinfektionen | 71 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4.3.1 | Reproduzierbarkeit der CMV-LightCycler-PCR | 71 |
| 4.3.2 | Ringversuche | 71 |
| 4.3.3 | Patientenproben | 72 |
| 4.3.4 | Patientenverlauf | 72 |
| 4.4 | Anwendung der <i>LightCycler</i> -Technologie zum Nachweis von Parvovirus B19 | 75 |
| 4.4.1 | Reproduzierbarkeit der Parvovirus B19-LightCycler-PCR | 75 |
| 4.4.2 | Ringversuche | 75 |
| 4.4.3 | Patientenproben | 76 |
| 5 | Diskussion | 79 |
| 5.1 | Fragestellung und Ziel | 79 |
| 5.2 | Methodenetablierung | 80 |
| 5.2.1 | Auswahl des fluoreszenzemittierenden Systems | 80 |
| 5.2.2 | Reaktionsansatz | 80 |
| 5.2.3 | Kopienstandards | 81 |
| 5.2.4 | Arbeitsablauf | 82 |
| 5.3 | Methodenevaluation | 84 |
| 5.3.1 | Humanes Adenovirus | 84 |
| 5.3.2 | Cytomegalievirus | 89 |
| 5.3.3 | Parvovirus B19 | 93 |
| 5.4 | Ergebnisse und deren Anwendbarkeit | 95 |
| 5.4.1 | Patientenverläufe | 95 |
| 5.4.2 | Anwendungsmöglichkeiten | 95 |
| 6 | Schlussfolgerungen | 97 |
| | Tabellenverzeichnis | I |
| | Abbildungsverzeichnis | II |
| | Literaturverzeichnis | IV |

Zusammenfassung

Einleitung Virusinfektionen sind im klinischen Alltag eine häufige Ursache von Erkrankungen. Insbesondere bei Patienten mit geschwächtem Immunsystem können sie schwere Infektionen mit kompliziertem Verlauf verursachen. Patienten, die aufgrund einer Transplantation lebenslang immunsuppressive Medikamente einnehmen, sind besonders gefährdet. Die am meisten exponierte Gruppe stellen Patienten dar, die sich einer Stammzell- oder Knochenmarktransplantation unterziehen. Bei diesen Patienten wird das körpereigene, kranke Immunsystem komplett zerstört, um es durch ein gesundes Immunsystem zu ersetzen. In der Phase des Anwachsens (Engraftment) besteht damit eine absolute Immunschwäche. Auch wenn sich das Immunsystem erholt hat, besteht noch eine lange Zeit ein Defizit an Immunzellen, die durch Virusinfektionen und Graft-versus-Host-Reaktionen verlängert werden kann. In der Zeit des Engraftments besteht eine hohe Infektionsanfälligkeit. Infektionen werden hierbei vor allem von opportunistischen Erregern verursacht.

Während der Phase der schweren kombinierten Immundefizienz nach Knochenmark- oder Stammzelltransplantation besteht ein erhöhtes Risiko für schwere, durch virale Infektionen ausgelöste Erkrankungen. In dieser Patientengruppe sind vor allem Viren von Bedeutung, die nach einem latenten Infektionsverlauf reaktiviert werden und dann auf einen geschwächten Organismus treffen. In diesem Rahmen ist vor allem das humane Cytomegalievirus zu nennen, welches für viele Komplikationen bei diesen Patienten verantwortlich ist. In den letzten Jahren trat eine andere Virusgruppe, die humanen Adenoviren, in den Vordergrund. Infektionen mit den humanen Adenoviren zeigen eine jährlich steigende Inzidenz in dieser Patientengruppe und sind oftmals mit schweren disseminierten Infektionen und hoher Mortalität verbunden. Die vorliegende Arbeit hat sich außerdem mit dem Parvovirus B19 auseinandergesetzt. Dieses Virus ist der Erreger des Erythema infectiosum und verursacht bei immundefizienten Patienten aplastische Krisen, die ebenfalls den Krankheitsverlauf ungünstig beeinflussen können.

Die quantitativen PCR-Methoden stellen eine Weiterentwicklung der PCR-Nachweismethoden dar. Der LightCycler ist ein computergestütztes System, bei dem der Verlauf

der Quantifizierung noch während der Durchführung am Monitor in Echtzeit verfolgt werden kann. Die Quantifizierung erfolgt durch die photometrische Bestimmung fluoriger Substanzen, welche durch die Präsenz von doppelsträngiger DNA oder bestimmter Zielsequenzen beeinflusst wird.

Ziele Das Anliegen der vorliegenden Arbeit war es, ein LightCycler-Verfahren zu entwickeln, mit dem eine sichere Quantifizierung von viraler DNA in kurzer Zeit möglich ist. Außerdem sollte eine ausreichende Sensitivität erreicht werden. Dieses Verfahren sollte dann auf die genannten Viren übertragen werden und anhand von Patientenproben war geplant, die Praktikabilität zu überprüfen.

Methodik Für jedes der nachzuweisenden Viren wurde ein an die Bedingungen der Realtime-PCR angepasstes Primerpaar definiert. Die Fluoreszenzsignale wurden nach dem Prinzip des *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET) erzeugt. Dafür wurden Sondenpaare entworfen, die jeweils an spezifische DNA-Abschnitte im Bereich zwischen den Primern binden sollten. Um den FRET auszulösen war jeweils eine Sonde des Paares am 3'-Ende mit Fluoreszenz markiert, während die andere Sonde am 5'-Ende mit *LC-Red 640* markiert war. Bei Hybridisierung der Sonden mit der Zielsequenz liegen die beiden Farbstoffmoleküle in unmittelbarer Nachbarschaft. Das Fluoreszenzmolekül wird durch die interne Lichtquelle des LightCyclers angeregt und überträgt die Energie auf das LC-Red 640 Molekül, welches Licht mit der Wellenlänge von 640 nm emittiert. Dieses resultierende Fluoreszenzsignal wird durch die internen Photometer des LightCyclers erfasst. Die Intensität des zu messenden Signals verhält sich proportional zur Menge der an die Zielsequenz gebundenen Hybridisierungssonden. Die Quantifizierung der Ergebnisse erfolgte anhand von Plasmid-Standards. Für jedes Virus wurde ein spezifisches Plasmid hergestellt. Anhand von Plasmidproben, die definierte Mengen von Plasmiden enthielten, wurden Standardkurven berechnet.

Ergebnisse Die LightCycler-PCR zum Nachweis von Adenovirus-DNA erfasst einen Bereich von $2,5 \times 10^1$ - $2,5 \times 10^7$ Genomäquivalente pro Reaktionsansatz. Das entspricht einem sicheren Nachweis von AdV-DNA ab 1000 Genomäquivalenten pro Milliliter Vollblut bzw. 600 Genomäquivalenten pro Milliliter Plasma. Insgesamt zeigten die Ergebnisse der LightCycler PCR eine hohe Übereinstimmung mit dem parallel durchgeführten konventionellen Nachweis von Adenovirus-DNA in einem Thermocycler. Zur Überprüfung des Testes wurden insgesamt 87 Patientenproben aus zwölf unterschiedlichen Pro-

benmaterialien untersucht. Um die Anwendbarkeit im Management von Infektionen zu demonstrieren, wurden retrospektiv drei Patientenverläufe rekonstruiert.

Die Standardkurve der LightCycler-PCR zum Nachweis von Cytomegalievirus-DNA erfasst einen Bereich von $2,19 \times 10^0$ - $2,19 \times 10^1$ Genomäquivalenten pro Reaktionsansatz. Das entspricht einem sicheren Nachweis von 88 Genomäquivalenten pro Milliliter Vollblut bzw. 53 Genomäquivalenten pro Milliliter Plasma. Zur Überprüfung des Testsystems wurden insgesamt 32 Patientenproben untersucht. Die Patientenprobe mit der geringsten Virusmenge enthielt fünf Genomäquivalente im Reaktionsansatz, das entspricht einer Viruslast von 200 Genomäquivalenten pro Milliliter. Zusätzlich erfolgte eine Überprüfung in Ringversuchen.

Die Standardreihe der LightCycler-PCR zum Nachweis von Parvovirus B19-DNA erfasst einen Bereich von 5×10^0 - 5×10^6 Geq pro Reaktionsansatz. Das entspricht einem sicheren Nachweis von 200 Genomäquivalenten pro Milliliter EDTA-Blut bzw. 120 Genomäquivalenten pro Milliliter Plasma. Die Parvovirus B19 LightCycler-PCR wurde ebenfalls im Ringversuch überprüft.

Schlussfolgerungen Es wurden sensitive Verfahren zum quantitativen Virus-DNA-Nachweis entwickelt. Die Nachweisverfahren beinhalten Viren, die besonders in der Patientengruppe der Transplantationsempfänger von Bedeutung sind. Die hohe Sensitivität wird auch den Anforderungen gerecht, die beim Management von Patienten nach Knochenmarktransplantation bzw. Stammzelltransplantation gestellt werden. Durch Darstellung der Infektionsverläufe wird es möglich sein, Therapieansätze zu überprüfen indem man die Effektivität direkt an der Viruslaständerung bewerten kann. Diese Methoden bieten vor allem durch die große Geschwindigkeit und den geringen Arbeitsaufwand eine schnelle, ressourcensparende Möglichkeit der Viruslastquantifizierung.

1 Einleitung

Während der ärztlichen Tätigkeit hat die Behandlung von Krankheiten, die durch verschiedenste Infektionserreger wie Bakterien, Viren und Pilze hervorgerufen werden, eine große Bedeutung.

Seit seiner Pränatalphase muss sich der menschliche Organismus mit den unterschiedlichsten Mikroorganismen, darunter zahlreiche humanpathogene Erreger auseinandersetzen. Die größte Bedeutung im Umgang des menschlichen Körpers mit seiner Umwelt kommt dem Immunsystem zu. Dieses beinhaltet unspezifische Abwehrmechanismen, wie z.B. physikalische Barrieren (Haut, Mukosa), eine zelluläre Abwehr (Granulozyten, Makrophagen, NK-Zellen) und chemische Barrieren (pH, Lipide, Enzyme, Komplementfaktoren, Akutphasenproteine, Interleukine), sowie eine erworbene spezifische Immunität.

Für Individuen mit funktionierendem Immunsystem sind die meisten Infektionen ohne therapeutische Hilfe beherrschbar. Bei schweren bakteriellen Infektionen kommen chemotherapeutisch wirksame Medikamente zum Einsatz. Virale Infektionen verlaufen meist selbstlimitierend oder müssen einer symptomatischen Behandlung zugeführt werden. Bei Patienten mit Immundefekten stellen Infektionen das größte Problem dar. Die meisten dieser Infektionen werden durch opportunistische Erreger verursacht, die beim Gesunden keine symptomatischen Infektionen verursachen. Ein Beispiel für einen solchen iatrogen verursachten Immundefekt stellen die Patienten dar, die sich aufgrund einer schwerwiegenden Grunderkrankung einer SZT unterziehen mussten.

Vor allem bei diesen Patienten ist die frühzeitige Diagnostik von Virusinfektionen von großer Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit soll die Entwicklung einer quantitativen Real-Time-PCR für verschiedene, für diese Patientengruppe besonders relevante DNA-Viren beschrieben werden. Eine Real-Time-PCR wurde hierbei für das LightCycler-Gerät der Firma Roche entwickelt, welches seit dem Jahre 1999 dem Institut für Virologie und Antivirale Therapie der Friedrich-Schiller-Universität Jena zur Verfügung steht.

1.1 Infektionen nach allogener Stammzelltransplantation

Das Infektionsrisiko nach allogener SZT wird durch das Stadium der Grunderkrankung, die Form der Vorbehandlung und vor allem durch die gewählte Transplantationsmodalität (Übereinstimmung in den HLA-Merkmalen zwischen Stammzellempfänger und -spender, T-Zelldepletion) bestimmt. Im Gegensatz zu Patienten, bei denen eine autologe SZT durchgeführt wird, besteht nach allogener SZT eine ausgeprägte Infektionsgefährdung in der frühen neutropenischen Phase, sowie nach der hämatopoetischen Rekonstitution aufgrund des unterschiedlich lang anhaltenden T- und B-Zell-Defektes. Die Mortalität durch Infektionen ist nach dem Engraftment deutlich höher als in der relativ kurz andauernden Neutropeniephase nach Transplantation. 60 % der fieberhaften Episoden nach allogener SZT sind mit Infektionen assoziiert (Walter und Bowden 1995 [105]).

Diese Patienten werden durch Infektionen mit opportunistischen Bakterien, Pilzen und Viren gefährdet. Beispiele hierfür sind bestimmte fakultativ pathogene Enterobacteriaceae und *Staphylococcus epidermidis*. Diese opportunistischen Bakterien haben oftmals Resistenzen gegen gängige Antibiotika entwickelt und verursachen schwer zu behandelnde nosokomiale Infektionen.

Mykosen, die sich während lang andauernden Granulozytopenien in den Geweben entwickelt haben, können sich in Folge der myeloablativen Vorbehandlung ausbreiten und akute Krankheitsbilder verursachen. Neben Neuinfektionen ist es auch möglich, dass latente Infektionen mit DNA-Viren, wie CMV, dem Epstein-Barr Virus (EBV) und AdV in den ersten Monaten nach SZT reaktiviert werden (Dini et al. 2001 [23]).

1.1.1 Virale Infektionen in den Phasen nach Stammzelltransplantation

Frühphase nach Stammzelltransplantation(Preengraftment)

In der Frühphase nach SZT besteht eine ausgeprägte Neutropenie, durch die eine hohe Infektionsgefährdung bedingt wird. 90% der Infektionen in dieser Phase werden durch Bakterien verursacht.

Es treten in dieser Phase aber auch Virusinfektionen auf. Die Häufigkeit von Infektionen mit dem Herpes-Simplex-Virus (HSV) bei seropositiven Patienten ohne suffiziente antivirale Prophylaxe wird mit über 70 % veranschlagt. Da aber bereits in Studien seit 1987 gezeigt wurde, dass mit Acyclovir ein wirksames Medikament zur Verfügung steht

und in fast allen Zentren eine Prophylaxe durchgeführt wird, treten disseminierte Infektionen nur noch selten auf (Gold und Corey 1987 [33]).

Ein in den letzten Jahren gehäuft beobachtetes Problem in allen Phasen der Posttransplantation sind Infektionen mit respiratorischen Viren (RSV, Parainfluenzavirus, Influenzavirus, AdV und Rhinovirus). Diese Viren können zu einer interstitiellen Pneumonie führen, die mit einer Letalität von ca. 50 % verbunden ist.

Mittlere Posttransplantationsphase

Diese Phase umfasst den Zeitpunkt von der hämatopoetischen Rekonstitution bis zum hundertsten Tag post transplantationem. Nach Engraftment des Transplantats bleibt ein quantitativer und funktioneller Immundefekt mit Mangel an T- und B-Lymphozyten bestehen.

Bei 74% aller Patienten mit allogener SZT treten nach Tag 50 noch Infektionen auf. Diese Infektionen sind vor allem viraler Genese (Einsele et al. 2003 [26]).

Späte Posttransplantationsphase (nach Tag +100 im Anschluss an die Stammzelltransplantation)

Infektionen in dieser Phase sind vor allem mit einer chronischen GvH-Reaktion assoziiert. Die Häufigkeit einer solchen liegt bei etwa 30% (Einsele et al. 2003 [26]). Patienten mit chronischer GvH-Reaktion haben einen kombinierten zellulären und humoralen Immundefekt. Sie weisen niedrige Konzentrationen von Immunglobulinen und sekretorischem IgA auf und die CD4-Zahl liegt unter 200 pro Microliter Blut.

Patienten mit chronischer GvH-Reaktion weisen ein erhöhtes Infektionsrisiko auf. Aus virologischer Sicht sind hier vor allem Infektionen mit CMV, VZV und EBV zu nennen. Das VZV verursacht bei Erstinfektion, zumeist bereits im Kindesalter, die Varizellen. Das Virus wandert nach Abklingen der Varizellen retrograd entlang der peripheren sensorischen Nerven zu den Spinalganglien des Rückenmarks bzw. zu zentralen Ganglien, wo es lebenslang persistiert. Bei Reaktivierung verursacht das Virus die Gürtelrose (Herpes zoster). Bei immunsuprimierten Patienten kann ein disseminierter Herpes zoster auftreten mit Beteiligung des gesamten Integuments. Die viszerale Beteiligung mit Pneumonie, Meningoenzephalitis und Hepatitis ist vor allem bei Patienten nach KMT- bzw. SZT gefürchtet.

EBV ist der Erreger der infektiösen Mononukleose. Nach einer zweiwöchigen Inkubationszeit manifestiert sich die Erkrankung typischerweise durch hohes re- oder intermittierendes Fieber. Zusätzlich besteht eine generalisierte Lymphknotenschwellung.

Kinder und Jugendliche mit angeborenen zellulären Immundefekten oder erworbener Immundefizienz zeigen eine eingeschränkte Immunkompetenz gegenüber EBV. EBV-infizierte B-Zellen können daher unkontrolliert auswachsen und zu poly-oligonalen B-Zell-Lymphoproliferationen bis hin zu monoklonalen malignen Lymphomen führen.

Virusdiagnostik nach SZT

Wie bereits erwähnt sind Patienten nach allogener SZT einem erhöhten Risiko ausgesetzt, an schweren, durch Viren ausgelösten Infektionen zu erkranken. In den letzten Jahren wurden große Fortschritte im Management viraler Infektionen gemacht. Dieser Fortschritt ist neben der Einführung effizienter antiviraler Medikamente auch der Entwicklung schneller und sensitiver Nachweisverfahren zu verdanken. Erst durch diese schnellen und sicheren Nachweismethoden ist die Möglichkeit einer präemptiven Therapie gegeben. Noch vor Auftreten der ersten Symptome wird eine Therapie sofort nach dem ersten Nachweis einer Virusinfektion begonnen (Reusser 2002 [78]).

Eine Virusanzucht in Zellkulturen ist sehr zeitaufwendig, ein Virusnachweis vor dem Auftreten der ersten klinischen Symptome einer Infektion ist somit kaum möglich. Serologische Nachweisverfahren sind bei Patienten mit geschwächtem Immunsystem aufgrund der beeinträchtigten Immunantwort nur von eingeschränktem Nutzen (Reusser 2002 [78]).

In der Patientengruppe der SZT- und KMT-Empfänger ist es außerordentlich wichtig, virale Infektionen frühzeitig zu erkennen. Noch vor der Transplantation sollte ein kompletter Serostatus von Empfänger und Spender vorliegen, da dieser den weiteren Verlauf und das therapeutische Vorgehen beeinflusst. Nach Transplantation ist ein virologisches Monitoring notwendig. Hierbei werden meist zweimal wöchentlich Proben in einem virologischen Labor untersucht.

1.1.2 Adenovirusinfektionen

Bei den humanen AdV handelt es sich um weltweit verbreitete humanpathogene DNA-Viren. Bei immunkompetenten Individuen verursachen sie meist selbstlimitierende Infektionen des oberen Respirationstraktes oder des Gastrointestinaltraktes.

Adenovirusinfektionen kommen regelmäßig bei Kindern vor, wobei höhere Infektionsraten bei Kindern unter fünf Jahren beschrieben werden (Cooper et al. 2000 [21]).

Es wurden bereits mehr als 51 verschiedene Serotypen identifiziert, von denen jedoch nur ca. ein Drittel mit Erkrankungen beim Menschen assoziiert sind (Ljungman 2004

[58]). In den vergangenen Jahren wurde eine ansteigende Inzidenz von AdV-Infektionen bei Patienten nach SZT beobachtet. Die Immunantwort auf AdV-Infektionen ist T-Zell-vermittelt. Aus diesem Grund haben Patienten mit T-Zell-Defekten ein erhöhtes Risiko, an einer AdV-Infektion zu erkranken.

Bei Ausbrüchen von AdV-Infektionen in Transplantationseinheiten wurde von einer nosokomialen Übertragung ausgegangen (Singh-Naz et al. 1993 [91]). Venard et al. fanden jedoch bei der Untersuchung eines anderen Ausbruches von Adenovirusinfektionen mehrere verschiedene Serotypen und keinen Anhalt für eine nosokomiale Verbreitung (Venard et al. 2000 [102]). Die Übertragung von Adenoviren könnte von Familienmitgliedern zum Patienten erfolgen, da eine hohe Durchseuchung mit Adenoviren gegeben ist und die am häufigsten vorkommenden Serotypen der Adenoviren mit denen der in der normalen pädiatrischen Population vorkommenden übereinstimmen.

Eine weitere Möglichkeit eine Adenovirusinfektion zu entwickeln, ist die Reaktivierung eines latent im Organismus persistierenden Virus oder eine Transplantat-assoziierten Übertragung. Runde et al. berichteten, dass das Vorhandensein von AdV-Antikörpern beim Stammzell-Spender mit dem Nachweis einer AdV-Infektion beim Transplantations-Empfänger assoziiert war (Runde et al. 2001 [81]).

Dini et al. und Ljungman hielten vor allem die Serotypen 1, 2 und 5 des Subgenus C der Adenoviren für die auftretenden Infektionen verantwortlich (Dini et al. 2001 [23] und Ljungman 2004 [58]). Shields et al. fanden vorwiegend die Serotypen 1, 34 und 35 des Subgenus B (Shields et al. 1985 [90]).

Inzidenz von Adenovirusinfektionen bei Empfängern von Stammzelltransplantationen

Die Inzidenz von Adenovirusinfektionen und disseminierten Erkrankungen variiert erheblich zwischen den einzelnen Studien, wobei die Häufigkeit der AdV-Infektionen in den letzten Jahren anstieg. Shields et al. beschrieben eine Inzidenz von 5% in einer Studie von 1985 (Shields et al. 1985 [90]), Bruno et al. rechneten mit einer Inzidenz von 8,5 % nach allogener SZT und 6,5 % nach autologer SZT (Bruno et al. 2003 [15]). In einer Studie aus dem Jahr 1994 fanden Flomenberg et al. eine Häufigkeit von 21%, mit einer großen Differenz zwischen Kindern (31%) und erwachsenen Patienten (13,6%) (Flomenberg et al. 1994 [31]). Die größte Häufigkeit von Adenovirusinfektionen fanden Hoffman et al. bei pädiatrischen Patienten nach SZT. Sie wiesen bei 47% dieser Patienten Adenoviren nach (Hoffman et al. 2001 [44]).

Andere vorangegangene Studien ergaben Häufigkeiten von 3-29% (Runde et al. 2001

[81], Lion et al. 2003 [57], Howard et al. 1999 [46], La Rosa et al. 2001 [79], Baldwin et al. 2000 [6], Hale et al. 1999[37] und Chakrabarti et al. 2002 [18]).

Bruno et al. berichten von einem höheren Risiko bei Zweittransplantation, sowohl nach allogener als auch nach autologer SZT (Bruno et al. 2003 [15]). Chakrabarti et al. sahen die T-Zell-Depletion als Riskofaktor für eine Adenovirusinfektion (Chakrabarti et al. 2001 [18]), während Runde et al. ein erhöhtes Infektionsrisiko bei Patienten mit akuter GvH-Reaktion beschrieben (Runde et al. 2001 [81]).

Krankheitsmanifestationen und infektionsassoziierte Mortalität

Pneumonien, Enzephalitiden und fulminante Hepatitiden sind die schwersten Krankheitsmanifestationen nach Infektionen mit Adenoviren in dieser Patientengruppe. Am häufigsten treten jedoch hämorrhagische Zystitiden und Gastroenteritiden auf. Nach einer asymptomatischen Phase der Infektion entwickeln diese Patienten immer mehr klinische Symptome, bis schließlich das volle Ausmaß einer fulminanten, disseminierten Infektion erreicht ist, die sich bis hin zum Multiorganversagen entwickeln kann.

Zu den Risikofaktoren, an einer Adenovirusinfektion zu erkranken, werden Alter (Kinder erkranken häufiger als Erwachsene), T-Zell depletierte Transplantate, GvH-Reaktion, die Verwendung von unpassenden, nicht verwandten Spendern gegenüber HLA-identischen Geschwister-Spendern und die Verwendung von nicht verwandtem Nabelschnurblut gezählt (Flomenberg et al. 1994 [31], La Rosa et al. 2001[79] und Hale et al. 1999 [37]). Desweiteren wird davon ausgegangen, dass sich das Risiko an einer manifesten Adenovirusinfektion zu erkranken mit dem Nachweis von Adenoviren in verschiedenen Organen erhöht.

Die Mortalität bei einer disseminierten Erkrankung ist trotz medikamentöser Intervention sehr hoch. Shields et al. berichteten von einer Mortalität bis zu 5% bei Patienten mit Adenovirusinfektion (Shields et al. 1985 [90]). In einer anderen Studie lag die Mortalität bei 54%, 7 von 13 Patienten mit einer Adenovirusinfektion starben (Flomenberg et al. 1994 [31]). La Rosa et al. berichteten von einer Gesamtmortalität von 26 %. Dreiundsiebzig Prozent der Patienten, die eine Pneumonie entwickelten und 61% der Patienten mit disseminierter Erkrankung, starben (La Rosa et al. 2001 [79]). Die höchste Mortalität ergab sich aus einer Studie von Howard et al., dort wird berichtet, dass 44 von 64 (69 %) Patienten mit einer Adenovirusinfektion verstarben (Howard et al. 1999 [46]). Während Runde et al. unter 35 Patienten mit Adenovirusinfektion keinen Todesfall verzeichneten (Runde et al. 2001 [81]).

Diagnostische Prinzipien

Infektionen mit hAdV sind in den letzten Jahren zu einem großen Problem im Mangement von Patienten nach Transplantationen geworden. Wie bereits erwähnt, schwankt die Inzidenz in den unterschiedlichen Studien zwischen 8,5 und 47 %. Aufgrund des Risikos von Patienten nach SZT an schweren disseminierten Infektionen zu erkranken und der damit verbundenen oft tödlichen Verläufe, ist eine frühzeitige Diagnose dieser Infektionen notwendig. Zum Nachweis der Infektionen mit humanen Adenoviren werden verschiedene Methoden verwendet. Hierbei stellt die Virusanzucht in einer Kultur mit nachfolgendem Immunfluoreszenz-Nachweis die am häufigsten genutzte Methode dar. Der Nachteil dieser Methode ist der große Zeitaufwand. Abhängig von der vorhandenen Viruslast dauert der Nachweis einige Tage. Alternativen sind der direkte Immunfluoreszenz-Nachweis oder der Antigennachweis mittels Enzymimmunoassays. Aktueller ist der Nachweis von Adenovirus-DNA mit Hilfe der PCR.

Der PCR-Nachweis aller bekannten 51 humanpathogenen Serotypen des Virus gestaltet sich schwierig. Die DNA-Homologie der Adenoviren innerhalb einer Subgruppe variiert zwischen 50 bis 100 %. Zwischen den Subgruppen kann die Basenhomologie weniger als 5 % betragen (Waldell 1984 [104]).

Eine Hauptaufgabe muss es sein, schwere disseminierte Infektionen in dieser Patientengruppe zu verhindern. Eine frühe Diagnose ist wichtig, weil antivirale Medikamente wie Ribavirin und Cidofovir möglicherweise nur im frühesten Krankheitsstadium wirksam sind (Arav-Boger et al. 2000 [4]). Echavarria et al. haben in einer Pilotstudie 2001 den Zusammenhang zwischen Virusnachweis mit der PCR und Entwicklung einer disseminierten Erkrankung herausgestellt (Echavarria 2001 [24]). In dieser Studie wurde gezeigt, dass der Nachweis von Adenovirus-DNA im Serum eine disseminierte Erkrankung vorher sagen kann, während dies mit dem Virusnachweis aus der Kultur aus unterschiedlichen Probenmaterialien nicht gelingt. Auf diesem Ansatz aufbauend, untersuchten Schilham et al. in einer retrospektiven Studie mittels semiquantitativer PCR die Viruslast im Serum bei Kindern nach allogener SZT. In dieser Studie fanden sie, dass 80% der Kinder mit einer als hoch eingestuften Viruslast eine disseminierte Erkrankung entwickelten. Im Gegensatz dazu ließen sich nur bei 7% der asymptomatischen Patienten eine hohe Viruslast im Serum nachweisen (Shilham et al. 2002 [84]).

Mittlerweile gibt es einige Studien, die zur Quantifizierung der Viruslast eine quantitative Real-Time-PCR verwenden (Lion et al. 2003 [57], Leruez-Ville et al. 2004 [55], Lankaster et al. 2002 [54] und Heim et al. 2003 [41]). Seidemann et al. untersuchten die Viruslast bei mehreren pädiatrischen Patienten nach Organ- oder Stammzelltransplan-

tation und kamen zu dem Ergebnis, dass ein Anstieg der AdV-Viruslast im Blut um mehr als eine Zehnerpotenz mit einem signifikanten Risiko einer fatalen disseminierten AdV-Infektion verbunden ist (Seidemann et al. 2004 [88]).

1.1.3 Cytomegalievirusinfektionen

Bei Cytomegalieviren handelt es sich um Viren aus der Gruppe der Herpesviren. Die Prävalenz der Durchseuchung liegt weltweit zwischen 40 und 100%, in Deutschland bei ca. 50%.

Nach der Primärinfektion persistiert das Virus lebenslänglich im Organismus. Dort verbleibt CMV latent in Blut-Monozyten. Die Immunabwehr gegen eine reaktivierte CMV-Infektion ist vor allem T-Zell vermittelt. Beim Immungesunden befindet sich eine hohe Anzahl von CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen im peripheren Blut, welche die Ausdehnung der Infektion einschränken. Aufgrund der Persistenz der Cytomegalieviren kommt es darauf an, dass die zelluläre Immunantwort, die aktiviert wurde um die Primärinfektion einzudämmen, aufrechterhalten wird. Wie bereits erwähnt, haben Patienten nach einer SZT einen temporären, aber dennoch schweren Immundefekt. Sie entwickeln schwere CMV-Infektionen mit Beteiligung mehrerer Organsysteme.

Die Infektion mit CMV ist eine der Hauptursachen für die infektionsassoziierte Mortalität nach allogener SZT. Ohne Infektionsprophylaxe tritt die CMV-Infektion zwischen Tag 30 und 100 nach Transplantation auf. Sissons and Carmichael gehen von einer Inzidenz zwischen 30 und 50% aus, dass Patienten aus dieser Gruppe eine klinisch relevante Symptomatik entwickeln (Sissons und Carmichael 2002 [93]).

Inzidenz einer CMV-Infektion nach allogener Stammzelltransplantation

Reusser berichtete von einer Inzidenz zwischen 60-70% bei seropositivem Spender oder Empfänger (Reusser 2002 [78]).

Durch Einführung von Ganciclovir ergibt sich die Möglichkeit einer effektiven Therapie (Boeckh et al. 1996 [9], Schmidt et al. 1991 [87], Verdonck et al. 1997 [103], Zaia et al 1995 [111]). Aufgrund der toxischen Wirkung auf das Knochenmark wird die antivirale Therapie nur zu einem Zeitpunkt verabreicht, an dem ein besonders hohes Risiko besteht, jedoch noch vor einer symptomatischen Erkrankung. Diese Strategie wird als präemptive Therapie bezeichnet. Hierbei wird ein engmaschiges Monitoring durchgeführt. Bei positivem Nachweis erfolgt die Gabe eines Virostatikums möglichst noch vor dem Beginn einer klinischen Symptomatik.

Als Ergebnis dieser Behandlungsstrategien verzeichnen Boeckh et al. den Rückgang der CMV-Erkrankung während der ersten drei Monate nach SZT von 20-30% auf unter 5% (Boeckh et al. 2003 [11]). Die Erfolge der präemptiven Therapie konnten zwar die Inzidenz einer CMV-Erkrankung in den ersten drei Monaten nach SZT verringern, es zeichnet sich jedoch ab, dass die Inzidenz klinisch manifester CMV-Infektionen jenseits von Tag 100 nach SZT zunimmt (Kim et al. 2004 [51]).

Boeckh et al. berichten von einer Inzidenz von 50% eine späte CMV-Infektion zu entwickeln (Boeckh et al. 2003 [12]). Während Kim et al. in einer Studie mit insgesamt 64 Patienten eine Inzidenz von 16,4% fanden (Kim et al. 2004 [51]). Hierbei besteht ein Zusammenhang zu einem CMV-Nachweis in der frühen Phase nach SZT (bis Tag 100). Boeckh et al. berichteten, dass der Nachweis des CMV pp65-Antigens innerhalb von drei Monaten nach allogener SZT einen hohen Risikofaktor darstellt eine späte CMV-Infektion zu entwickeln (Boeckh et al. 2003 [12]). Während Peggs et al. das Risiko einer späten CMV-Infektion als minimal einschätzten, wenn innerhalb der ersten hundert Tage nach allogener SZT kein Nachweis von CMV gelang (Peggs et al. 2000 [71]).

Krankheitsmanifestationen und Mortalität

Ein bedeutender Faktor, der die Überlebensrate nach allogener SZT beeinflusst, ist der vor Transplantation bestehende CMV-Serostatus des Empfängers. Trotz Prophylaxe und präemptiver Therapie ist es noch nicht gelungen, die mit der allogenen Stammzell-Transplantation assoziierte Mortalität von CMV-seropositiven Patienten auf das Niveau von seronegativen Patienten zu reduzieren (Boeckh et al. 2004 [10]). Große Studien, die den Zusammenhang von CMV-Serostatus und Mortalität untersuchten, belegten, dass seropositive Empfänger im Hinblick auf die Mortalität benachteiligt sind (Craddock et al. 2001 [22] und McGlave et al. 2000 [63]).

Die CMV-Erkrankung manifestiert sich nach einer SZT vor allem als Pneumonie, Gastroenteritis oder Hepatitis. Die Letalität nach Manifestation der CMV-Erkrankung ist trotz Ganciclovir und CMV-Hyperimmunglobulin immer noch sehr hoch. In einer Studie von Ljungman et al. von 1992 überlebten trotz initialem Ansprechen von 60-80% nur 31% der Patienten das Auftreten einer CMV-induzierten interstitiellen Pneumonie länger als drei Monate (Ljungman et al. 1992 [60]). Neuere Daten zeigten, dass die CMV-Pneumonie trotz Behandlung mit Ganciclovir und Hyperimmunglobulin mit einer Mortalität von 45-78% assoziiert ist (Reusser 2002 [78] und Ljungman et al. 2001 [59]).

Diagnostische Prinzipien

Infektionen mit CMV führen in dieser Patientengruppe häufig zu Komplikationen. Die Mortalität der CMV-Erkrankung ist, trotz vorhandener antiviral wirksamer Medikamente und CMV-Hyperimmunglobulin, immer noch hoch. Mit der Einführung einer präemptiven Therapie im Gegensatz zu einer generellen Prophylaxe für alle Patienten konnten gewisse Erfolge erzielt werden. Für eine funktionierende präemptive Therapie ist es jedoch notwendig, die Anzeichen einer drohenden CMV-Erkrankung frühzeitig zu erkennen.

Um das humane CMV nachzuweisen, wurden viele verschiedene Testsysteme verwendet: Shell-vial Assay (Nicholson et al. 1997 [67]), pp65-Antigenämie Test (Boeckh et al. 1996 [9]) und in den letzten Jahren verschiedene qualitative und quantitative PCR-Methoden, die das Virus in Blut, Leukozyten oder Plasma nachweisen (Tong et al. 2000 [99], Tanabe et al. 1997 [98], Weinberg et al. 2000 [107]).

Der pp65-Antigennachweis ist immer noch eine Standardmethode zum Monitoring dieser Patienten auf CMV-Infektionen. Boeckh et al. stellten bereits 1996 eine präemptiven Therapieansatz mit Hilfe der pp65-Methode vor (Boeckh et al. 1996 [9]). Ein Vorteil des pp65-Nachweises ist die gute Korrelation mit klinischen Symptomen. In einem Review von Meijer et al. werden jedoch die Nachteile des pp65-Antigenämie Testes gegenüber molekularen Monitoringmethoden herausgestellt (Meijer et al. 2003 [65]). Es wird bemerkt, dass der pp65-Antigennachweis während der Neutropeniephase nicht durchgeführt werden kann. Der Test ist sehr arbeits- und zeitaufwendig. Desweiteren wird eine Kasuistik angeführt, in dem der Antigennachweis ein falsch negatives Ergebnis bei einem Patienten nach SZT mit CMV-Erkrankung erbrachte. Die Nachuntersuchung mit einem anderen Antigenpool ergab einen hohen Antigenlevel (Seropian et al., 1998 [89]). Zusammenfassend bringen Meijer et al. zum Ausdruck, dass PCR-basiertes Monitoring von CMV sensitiver ist als der Antigennachweis. Ein weiterer Vorteil der PCR-basierten Methoden ist die Durchführbarkeit bei neutropenischen Patienten.

Emery et al. zeigen in einer Studie aus dem Jahre 2000 den Vorteil einer Quantifizierung der Viruslast bei Patienten nach Leber-, Nieren- und Knochenmarktransplantationen. Sie postulieren unter Berücksichtigung anderer Risikofaktoren die initiale Viruslast als Hauptrisikofaktor für die Entwicklung einer manifesten CMV-Erkrankung (Emery et al. 2000 [28]). In mehreren Studien wird die Bedeutung einer quantitativen Messung der Viruslast hervorgehoben, um die Mechanismen einer CMV-Infektion genauer zu verstehen, die Entwicklung einer manifesten Erkrankung vorherzusagen und den Infektionsverlauf kontrollieren zu können (Emery et al. 2000 [28], Howden et al. 2003 [47],

Pang et al. 2003 [69], Gouarin et al.,2004 [34]).

1.1.4 Infektionen mit Parvovirus B19

Das Parvovirus B19 ist das einzige humanpathogene Virus aus der Familie der Parvoviridae. Es handelt sich hierbei um ein kleines, einzelsträngiges DNA-Virus ohne Hülle. Das Parvovirus B19 ist weltweit verbreitet. Die Infektionsraten in Europa, Asien und in den Vereinigten Staaten von Amerika sind ähnlich (Young und Broen 2004 [109]). Cohen beschreibt in einer Studie von 1988 die Prävalenz von IgG-Antikörpern gegen das Virus in England und Wales. Demnach beträgt sie im Vorschulalter ca. 10%. Schon im Schulalter steigt die Prävalenz auf ca. 60%, während bei Erwachsenen eine Prävalenz bis zu 90% vorliegt (Cohen et al. 1988 [20]).

Das Virus wird in Sekreten des Respirationstraktes gefunden. Die Übertragung erfolgt durch direkten Kontakt. Außerdem ist eine vertikale Übertragung von Mutter zum Feten möglich. Beim Feten kann das Virus einen Hydrops fetalis verursachen. Das Mortalitätsrisiko des Feten liegt bei Erstinfektion der Mutter bei 6-8% (Guidozzi et al. 1994 [36]). Ein weiterer Übertragungsweg ist die parenterale Transfusion von kontaminierten Blutprodukten. Das Fehlen einer Lipidhülle und die große Stabilität des Genoms machen die Parvoviren resistent gegen Inaktivierung durch Hitze oder lösliche Detergenzien (Young und Brown 2004 [109]). Das Übertragungsrisiko wird hierbei mit 1:3300 angegeben (McOmish et al. 1993 [64]).

Krankheitsmanifestationen und Inzidenz

Beim immunkompetenten Individuum verlaufen Parvovirus B19-Infektionen meist asymptomatisch. Die häufigste klinische Erscheinungsform bei Kindern ist das Erythema infectiosum. Bei Erwachsenen, speziell Frauen im mittleren Alter, kann die Infektion klinisch symptomatische Artropathien verursachen. Gewöhnlicherweise verschwinden die Symptome einer von Parvovirus B19 ausgelösten Arthritis innerhalb von wenigen Wochen und selbst wenn die Beschwerden über Monate persistieren, ist nicht mit einer Gelenkdestruktion zu rechnen (Young und Brown 2004 [109]).

Infektionen mit Parvovirus B19 stellen bei Patienten nach SZT kein Problem des Ausmasses von CMV-Infektionen oder Infektionen mit Adenovirus dar. Dennoch haben sie die Möglichkeit latent im menschlichen Gewebe zu verbleiben oder mit einer geringen Virusaktivität zu persistieren (Söderlund et al. 1997 [96]). Ein Mangel an Antikörpern verschafft Parvovirus B19 die Möglichkeit im Organismus zu persistieren. In diesem

Fall entwickelt sich kein symptomatisches Erythema infectiosum, weil keine Antigen-Antikörper-Komplexe gebildet werden können. Es besteht die Möglichkeit, dass sich eine persistierende Parvovirus B19-Infektion als aplastische Krise manifestiert (Young and Brown 2004 [109]). Bei Patienten mit beeinträchtigtem Immunsystem kann eine persistierende Virämie zu einer Retikulozytopenie mit Anämie führen.

Broliden geht bei pädiatrischen Patienten nach Organtransplantation und bei Patienten nach KMT von einer Inzidenz der Parvovirus B19-Infektionen von ca. 1-2% aus (Broliden, 2001). Unter Patienten einer Klinik für pädiatrische Hämatologie und Onkologie war die Prävalenz von Parvovirus B19-DNA im Knochenmark ca. 10%. Die Hälfte dieser Patienten litt unter einer infektassoziierten Anämie oder Panzytopenie (Broliden et al. 1998 [14]). Broliden sieht darin einen Hinweis darauf, dass eine Persistenz von Parvovirus B19 häufiger vorkommt als bisher vermutet. In einer Studie von Söderlund et al. wurde Parvovirus B19 als Ursache von Komplikationen nach KMT bei Erwachsenen herausgestellt (Söderlund et al. 1997 [96]). Zusätzlich sind Fälle von Parvovirus B19-assoziiertem akuten Herzversagen und Hepatitis bei erwachsenen Knochenmarkempfängern beschrieben worden (Schleuning et al. 1999 [86]).

Diagnostische Prinzipien

Die Bedeutung von Parvovirus B19 als Infektionserreger bei Patienten nach SZT oder Organtransplantation ist geringer als die der Adenoviren oder die der Gruppe der Herpesviren. Diese Patienten haben jedoch ein erhöhtes Risiko einer persistierenden Parvovirus B19-Infektion, die sich klinisch als chronische Retikulozytopenie äußern kann.

Die Diagnose von unkomplizierten Infektionen mit Parvovirus B19 wird normalerweise klinisch gestellt und gegebenenfalls durch den serologischen Nachweis von spezifischen IgM-Antikörpern vervollständigt. Der Nachweis von spezifischen IgG-Antikörpern hat keinen diagnostischen Nutzen, um eine akute Infektion nachzuweisen. Ungefähr zwei Wochen nach der Infektion wird der IgG-Titer normalerweise positiv und persistiert dann lebenslänglich (Heegard und Brown 2002 [40]). Serologische Nachweismethoden sind jedoch für die Diagnose von Parvovirus B19-Infektionen, die sich als transiente aplastische Krisen manifestieren, oder für die Diagnose von chronischen Infektionen bei immuninkompetenten Patienten, nicht geeignet. Hier ist ein Nachweis von Parvovirus B19-DNA mittels molekularvirologischer Methoden, z.B. PCR, notwendig.

Aufgrund der größeren Empfindlichkeit ist die PCR-Methode gegenüber der direkten Hybridisierung (Detektionslimit 10^5 Genomäquivalente pro Milliliter) im Vorteil. Eine Weiterentwicklung der qualitativen PCR stellt auch bei Parvovirus B19 die Etablierung

von quantitativen PCR-Methoden dar (Harder et al. 2001 [38]). Eine Kontrolle der Viruslast während der Therapie könnte sich als nützlich erweisen (Plentz et al. 2004 [73]).

1.2 LightCycler-Technologie

Seit ihrer Entwicklung hat die PCR-Methode die molekularbiologischen Nachweisverfahren revolutioniert. Bei dieser Methode werden DNA-Stränge vervielfacht, indem die verschiedenen Arbeitsschritte (Abschmelzen der Doppelstrang-DNA bei 94°C, Anlagern der Primer bei ca. 60°C, Verdopplung der Einzelstränge durch die Taq-Polymerase bei 72°C) zyklisch wiederholt werden. Da die unterschiedlichen Arbeitsschritte bei verschiedenen Temperaturen ablaufen, müssen die zu untersuchenden Proben in einem Zyklus auf die benötigten Temperaturen erhitzt bzw. abgekühlt werden. Dieser Zyklus wird dann mehrfach wiederholt um eine exponentielle Vervielfachung der Proben-DNA zu erhalten. Zu diesem Zweck gibt es Geräte, sogenannte Thermocycler, die mit einer Thermokammer aus Metall ausgestattet sind und es ermöglichen, die verschiedenen Temperaturen und Zyklenzahl, die benötigt werden, zu programmieren und dann selbstständig auszuführen.

Der LightCycler unterscheidet sich von einem konventionellen Thermocycler in zwei grundlegenden Dingen. Erstens besitzt das Gerät keinen Thermoblock aus Metall, sondern eine Thermokammer in der Luft erhitzt und abgekühlt wird. Dieses System ermöglicht einen sehr schnellen Temperaturwechsel in der Thermokammer. Dieser Temperaturwechsel kann mit einer Rate von bis zu 20 °C pro Sekunde erfolgen. Der Reaktionsansatz wird in Glaskapillaren (siehe Abbildung 1.1) pipettiert, die im Verhältnis zum Volumen eine sehr hohe Oberfläche besitzen. Die Verbindung zwischen diesen Glaskapillaren und der mit Luft arbeitenden Thermokammer ermöglicht einen sehr viel schnelleren Ablauf der für die PCR notwendigen Reaktionen. Der zweite grundlegende Unterschied zu konventionellen Thermocyclern ist die optische Einheit, mit der man Fluoreszenzmessungen vornehmen kann. Der LightCycler besitzt eine LED (light-emitting diode) als Lichtquelle, die blaues Licht einer Wellenlänge von 470 nm aussendet und drei Detektionskanäle, die emittiertes Licht in den Wellenlängen 530 nm (Kanal 1), 640 nm (Kanal 2) und 730 nm (Kanal 3) messen können. Die gemessenen Daten können schließlich auf einem dem System angeschlossenen PC visualisiert werden. So ist es möglich, während einer laufenden PCR-Reaktion, die Fluoreszenzdaten auf dem Monitor direkt zu verfolgen.

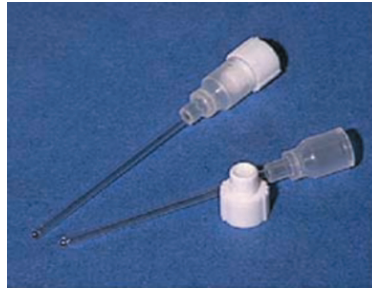


Abbildung 1.1: **Glaskapillaren.**Bild aus dem LightCycler Manual entnommen

1.2.1 Fluoreszenz-emittierende Systeme zum Echtzeit-PCR-Monitoring

SYBR Green als interkalierender Fluoreszenzfarbstoff

Diese Methode arbeitet mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green. Bei SYBR Green handelt es sich um einen fluorogenen Farbstoff, der mit doppelsträngiger DNA interkaliert. Die SYBR Green-Partikel interkalieren sofort mit neu gebildeter doppelsträngiger DNA. Nach der Elongationszeit ist die Konzentration interkalierender Partikel, die zwischen den einzelnen Basen der Nukleinsäure festsitzen, am größten. Diese SYBR Green-Partikel werden durch das blaue, 470 nm lange Licht der Lichtquelle angeregt und emittieren Licht in einer Wellenlänge von 530 nm, das vom ersten Kanal der optischen Einheit des LightCyclers gemessen werden kann. Das emittierte Licht ist proportional zur vorhandenen Menge an doppelsträngiger DNA. Werden die Doppelstränge in der Denaturationsphase wieder aufgelöst, wird auch der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff frei, um sich nach der nächsten Elongationsphase wieder in die DNA-Doppelstränge einzulagern.

Fluoreszenzfarbstoff-markierte Hybridisierungssonden

Zur Quantifizierung werden dem Reaktionsansatz zwei markierte Sonden zugegeben, die an eine bestimmte Nukleotid-Sequenz innerhalb des zu amplifizierenden DNA-Fragments binden. Die erste Sonde ist mit einem Fluoreszein-Farbstoff am 3'-Ende markiert. Die zweite Sonde ist am 5'-Ende mit LC-Red 640 markiert. LC-Red 640 ist ein spezieller Farbstoff, der Licht mit einer Wellenlänge von 640 nm emittiert. Während der Annealing-Phase der PCR-Reaktion binden die beiden Sonden an die Einzelstrang-DNA. Wird der Fluoreszein-Farbstoff von der Lichtquelle des LightCyclers angeregt, wird die resultie-

rende Fluoreszenzenergie auf das in unmittelbarer Nachbarschaft befindliche LC-Red 640-Molekül übertragen, welches diese Energie in Form von Licht mit der Wellenlänge von 640 nm emittiert. Dieses wird von Kanal 2 der optischen Einheit im LightCycler gemessen. Der Energietransfer von einem Farbstoff zum anderen wird als FRET (Fluorescence Energy Resonance Transfer) bezeichnet (Abbildung 1.2). In der Elongationsphase der Reaktion werden die beiden Sonden von der Taq-Polymerase verdrängt, um sich in der Annealingphase des folgenden Zyklus wieder spezifisch an den DNA-Einzelstrang zu binden. Dadurch kommt es neben der Amplifizierung der Zielsequenz zusätzlich zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals, welches sich proportional zu der in der Probe enthaltenen Menge der Ziel-DNA verhält. Für dieses Testformat ist noch ein weiterer Farbstoff mit der Bezeichnung LC Red 705 erhältlich. Dieser Farbstoff funktioniert wie das LC Red 640, emittiert das Licht aber in einer Wellenlänge von 710 nm, welches von Kanal 3 der optischen Messeinheit im LightCycler erfasst wird.

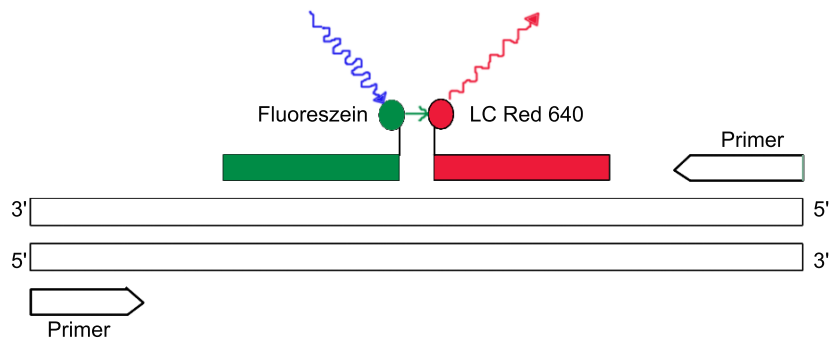


Abbildung 1.2: **FRET** (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*)
. Erklärung siehe Text.

1.2.2 Quantitative Bestimmung der DNA-Menge im LightCycler

Die Software des LightCyclers speichert die Messdaten der einzelnen Fluoreszenzkanäle. Die Fluoreszenzdaten werden gegen die Zyklenzahl in einem Koordinatensystem aufgetragen und auf dem Computermonitor ausgegeben. Die resultierenden Kurven zeigen die DNA-Amplifikation der Proben im Verhältnis zur Zyklenzahl. Die Anzahl von PCR-Produkten steigt in den ersten PCR-Zyklen logarithmisch an und erreicht im weiteren Verlauf eine Plateau-Phase. Zur Messung der genauen Konzentration, in der die DNA in

der ursprünglichen Probe vorliegt, liefert die Phase, in der sich die Produktkonzentration mit jedem Zyklus verdoppelt, die genauesten Aussagen. Diese Phase wird als log-linear-Phase bezeichnet. In der Plateau-Phase unterscheiden sich die DNA-Konzentrationen nicht mehr wesentlich, während in der log-linear-Phase die Kurven der einzelnen Proben parallel zueinander verlaufen und eine Unterscheidung der ursprünglich vorhandenen DNA-Konzentration möglich ist (siehe Abbildung 1.3). Die LightCycler-Software definiert die Zahl des Zyklus, an dem die log-linear-Phase einer Probe begonnen hat, als Crossing Point. Je kleiner der Crossing Point einer Probe, desto schneller ist die PCR-Reaktion in die log-linear-Phase eingetreten und dementsprechend höher ist die ursprüngliche DNA-Konzentration in der Probe. Führt man in einem Versuch definierte Standards mit, die eine genau bekannte DNA-Konzentration besitzen, kann man eine Standardkurve berechnen. Mit Hilfe dieser kann dann die DNA-Menge in den unbekanntenen Proben bestimmt werden.

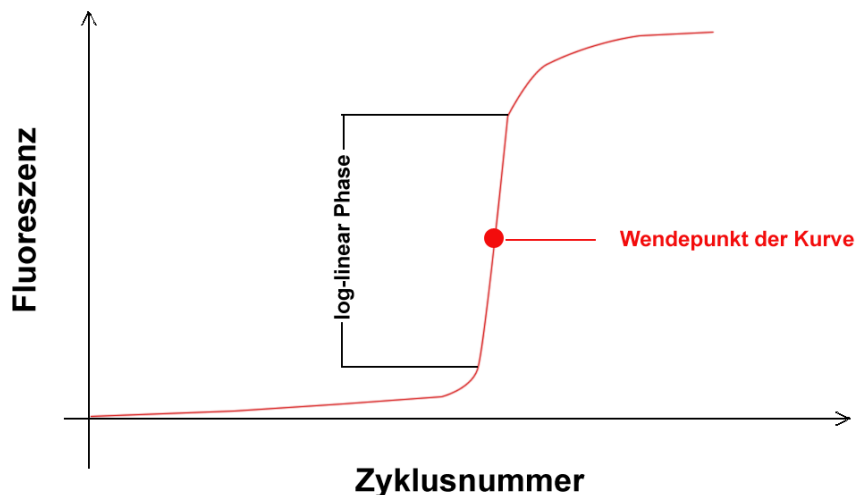


Abbildung 1.3: Diese Abbildung zeigt die Kinetik einer PCR-Reaktion im LightCycler. Erklärung siehe Text.

1.2.3 Schmelzpunktanalyse

Jedes entstandene Amplikon besitzt eine spezifische Schmelztemperatur T_m . Diese ist definiert als die Temperatur, bei der die Hälfte aller Hybride dissoziiert. Dieser spezifische Schmelzpunkt hängt bei einem festgelegten Medium von der Länge, dem Guanin-

und Cytosin-Anteil des Amplikons und von eventuellen Basenfehlpaarungen ab. Basenfehlpaarungen verringern den Schmelzpunkt.

Direkt im Anschluss an die Quantifizierung im LightCycler wird die Temperatur ausgehend von der Annealing-Temperatur der Primer langsam auf 94 °C gesteigert. Während dessen wird kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen.

Wird ein interkalierender Farbstoff eingesetzt (z. B. SYBR Green I), ist beim Aufschmelzen der DNA-Doppelstränge eine Verminderung des Fluoreszenzsignals zu beobachten, da ein Interkalator am einzelnen DNA-Strang deutlich weniger fluoresziert als am DNA-Doppelstrang. Im Falle der Hybridisierungssonden kommt es ebenfalls zu einer Abnahme des Fluoreszenzsignals, sobald eine der Hybridisierungssonden abschmilzt und somit kein FRET mehr stattfindet.

In beiden Fällen wird die erste Ableitung der resultierenden Schmelzkurven berechnet. So ergeben sich Peaks, die für verschiedene Amplikons spezifisch sind. Auf diese Weise lassen sich sowohl spezifische von unspezifischen Produkten trennen, als auch die Identität der spezifischen Produkte nachweisen.

Test

2 Ziele der Arbeit

Eine genaue und schnelle Virusdiagnostik ist für Patienten, die sich einer allogenen SZT unterziehen müssen, von großer Relevanz. Wie bereits in dem vorangegangenen Kapitel erläutert, haben die molekularbiologischen Nachweisverfahren von Virus-DNA an Bedeutung gewonnen. Die Nachweisverfahren, basierend auf einer PCR-Reaktion, haben den Vorteil einer höheren Sensitivität und können auch in Phasen der Neutropenie durchgeführt werden, sobald serologische Methoden an ihre Grenzen stoßen. Es wurde jedoch auch herausgestellt, dass eine Quantifizierung der Viruslast von großem diagnostischen Wert ist, um Infektionsverläufe, Therapieeffekte und die Unterscheidung von Neuinfektion oder Reaktivierung zu beurteilen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll eine Methode zum quantitativen Nachweis von Virus-DNA vorgestellt werden. Der Nachweis umfasst Parvovirus B19, hAdV und CMV. Vor allem Infektionen mit hAdV und CMV verursachen in dieser Patientengruppe lebensbedrohliche Komplikationen. Für Infektionen mit Parvovirus B19 sind ebenfalls Komplikationen bei Patienten mit beeinträchtigtem Immunsystem beschrieben.

Folgende Zielsetzungen sollten erreicht werden:

Etablierung einer Real-Time-PCR zum Nachweis von Virus-DNA

Es sollte eine Real-Time-PCR für das LightCycler-Gerät entwickelt werden, welche sich auch auf andere DNA-Viren übertragen lässt. Die Etablierung dieser Methode umfasste die Optimierung des Reaktionsansatzes, die Berechnung von Standardkurven aus Plasmid-DNA und die Quantifizierung mittels berechneter Standardkurven. Die Etablierung der Methode erfolgte zunächst für Parvovirus B19.

Insbesondere sollte im Hinblick auf die Qualitätssicherung eine Zertifizierung der Methoden in Ringversuchen realisiert werden.

Anwendung der Real-Time-PCR zum Nachweis verschiedener DNA-Viren

Die erarbeiteten Grundlagen sollten auf unterschiedliche, für Patienten nach KMT oder SZT relevante, DNA-Viren übertragen werden:

CMV Im Institut für Virologie und Antivirale Therapie diente bisher der pp65-Antigenämie Test zur Quantifizierung der Viruslast. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte eine Real-Time-PCR zur Quantifizierung von CMV-DNA etabliert werden.

Humanes Adenovirus Die humanen Adenoviren gewannen in den letzten Jahren für diese spezielle Patientengruppe immer mehr an Bedeutung. Ziel war die Etablierung einer Methode zur Quantifizierung von AdV-DNA. Da es sich bei AdV um eine sehr heterogene Gruppe handelt, sollten möglichst viele, vor allem für diese Patientengruppe relevanten Serotypen 1, 2, 5, 34 und 35, erfasst werden.

Evaluierung der Methoden

Zur Evaluierung der Nachweisverfahren wurden unterschiedliche Patientenproben retrospektiv getestet und mit den qualitativen Ergebnissen verglichen. Dabei handelte es sich um asservierte DNA-Eluate aus verschiedenen Materialien unterschiedlicher Patienten. Für die unterschiedlichen Patienten sollten exemplarisch Verläufe der Viruslast angefertigt werden. Die etablierten Methoden sollten außerdem im Ringversuch getestet werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Biologische Materialien

Das Institut für Virologie und Antivirale Therapie der Friedrich-Schiller-Universität Jena führt für einige Universitätskliniken die molekularbiologischen Methoden zum Virusnachweis durch.

In der vorliegenden Arbeit wurden Probenmaterialien von Patienten analysiert, die im Rahmen der virologischen Diagnostik dem Institut für Virologie und Antivirale Therapie der Friedrich-Schiller-Universität Jena zugeführt wurden. Diese Probenmaterialien lagen entweder bereits als asservierte DNA-Eluatate aus verschiedenen Geweben vor und wurden retrospektiv untersucht oder wurden im Rahmen der virologischen Diagnostik frisch aufgearbeitet. Tabelle 3.1 gibt eine Übersicht über die verwendeten Proben.

Tabelle 3.1: Verwendete Patientenproben

| Patientenproben | n | Herkunft |
|------------------------|----------|--|
| EDTA-Blut | 53 | Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, FSU Jena |
| Blutplasma | 36 | Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, FSU Jena |
| Myokardbiopsie | 24 | Klinik für Innere Medizin I, FSU Jena |
| Urin | 12 | Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, FSU Jena |
| Augenabstrich | 10 | Klinik für Augenheilkunde, FSU Jena |
| Tubusabstrich | 7 | Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, FSU Jena |
| Aszites | 6 | Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, FSU Jena |
| Stuhl | 5 | Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, FSU Jena |
| Rachenspülwasser | 4 | Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, FSU Jena |
| Leberbiopsie | 2 | Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, FSU Jena |
| Trachealsekret | 2 | Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, FSU Jena |
| Mageninhalt | 2 | Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, FSU Jena |
| Knochenmark | 1 | Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, FSU Jena |

3.1.2 Geräte und Hilfsmittel

Geräte

Tabelle 3.2: Verwendete Geräte

| Bezeichnung | Hersteller |
|---|--|
| 37°C Inkubator | Kendro; Langenselbold |
| 37°C Schüttelinkubator Inova TM 4000 | New Brunswick Scientific; Edison, NJ, USA |
| Elektrophoreseauswertungssystem (E.A.S.Y.) | Herolab GmbH; Wiesloch |
| Feinwaage | Sartorius AG; Göttingen |
| LightCycler [®] 2.0 System | Roche Diagnostics GmbH; Mannheim |
| LightCycler [®] Software 3.5 | Roche Diagnostics GmbH; Mannheim |
| LightCycler [®] Kapillaren 20 μ l | Roche Diagnostics GmbH; Mannheim |
| Petrischalen | Nunc GmbH; Wiesbaden |
| Photometer Ultrospec2000 | Amersham Pharmacia Biotech; Piscataway, NJ, USA |
| Photometer (Dynatech MR 500 UV-160A UV-Visible) | Recording Spectrometer Shimadzu Corp. Europe; Duisburg |
| Pipetten 10 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 1000 μ l | Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH; Hamburg |
| Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml | Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH; Hamburg |
| Reaktionsgefäße 50 ml | Greiner Labortechnik GmbH; Frickenhausen |
| Sequenzierer ABI Prism 310 Genetic Analyzer | Applied Biosystems GmbH; Darmstadt |
| Thermocycler Perkin Elmer GeneAmp PCR System 9600 | Applied Biosystems GmbH; Darmstadt |
| Thermocycler MJ Research Peltier Thermal Cycler PTC-200 | Applied Biosystems GmbH; Darmstadt |
| Transilluminator für Agarosegele | Herolab GmbH; Wiesloch |
| Vakuumkonzentrator Eppendorf concentrator 5301 | Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH; Hamburg |
| Waage | Sartorius AG; Göttingen |
| Zentrifuge Cytospin-3 | Shandon; Pittsburgh, USA |
| Zentrifuge Eppendorf 5415 D | Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH; Hamburg |
| Zentrifuge Eppendorf 5417 C | Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH; Hamburg |
| Zentrifuge Hettich Universal 16 | Hettich Zentrifugen; Tuttlingen |
| Zentrifuge Heraeus Sepatech Biofuge 22R | Kendro; Langenselbold |

Bakterien

Tabelle 3.3: Verwendete Bakterien

| Stamm | Genotyp | Verwendung |
|--------------|--|-------------------|
| DH5 α | F ⁻ [ϕ (<i>lacZ</i> M15) <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-lhsd</i> R17(<i>r_K</i> ⁻ <i>m_K</i> ⁺) <i>supE44 relA1 deoR</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 | Plasmidklonierung |
| XL10-Gold | Tet ^R Δ (<i>mcrA</i>)183 Δ (<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> Hte[F' <i>proAB lacI^q Z</i> Δ M15 Tn10 (Tet ^R) Amy Cam ^R] | Plasmidklonierung |

Plasmid

pUC19 (GenBank Accession No. X02514)

Pharmacia Biotech

Ampizillin-Resistenzgen und Replikationsursprung sind von pBR322 abgeleitet. Außerdem enthält pUC19 einen Teil des *E. coli lacZ*-Gens (*lacZ'*), das für ein Peptid zur α -Komplementation kodiert und die multiple Klonierungsstelle enthält. Diese besitzt Schnittstellen für *EcoRI*, *SacI*, *KpnI*, *SmaI*, *XmaI*, *BamHI*, *XbaI*, *SalI*, *AccI*, *HincII*, *PstI*, *SphI* und *HindIII*. siehe Abbildung 3.1

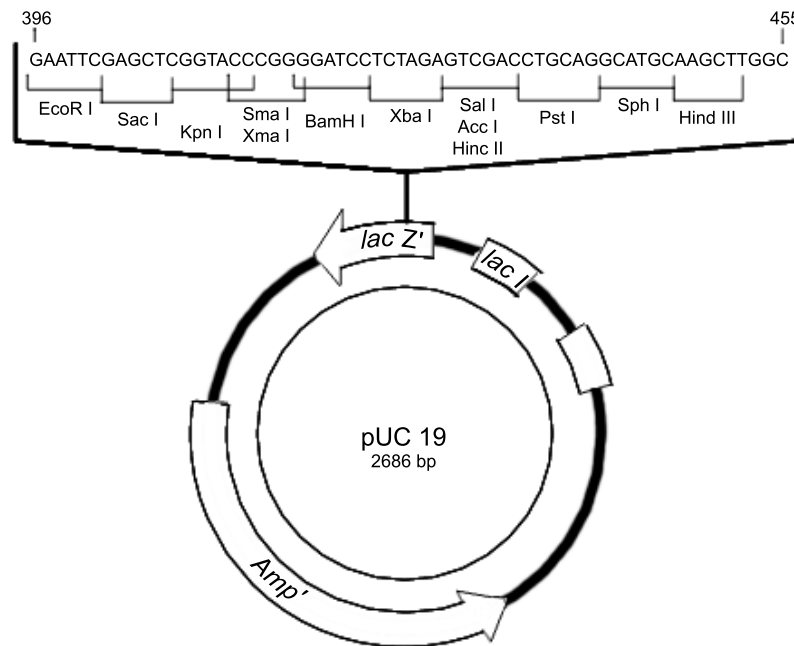


Abbildung 3.1: pUC19

3.1.3 Chemikalien, Marker, Enzyme, Kitsysteme

Chemikalien

Tabelle 3.4: Verwendete Chemikalien

| Name | Hersteller |
|---|---|
| λ -DNA | Roche Applied Sciences; Mannheim |
| Agar | Difco Laboratories GmbH; Augsburg |
| Agarose | Gibco-Lifetechnologies GmbH, Eggenstein |
| Ampicillin | Fluka-Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Deisenhofen |
| Bacto-Trypton | Difco; USA |
| Borsäure | Merck KGaA; Darmstadt |
| Bromphenolblau | Fluka-Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Deisenhofen |
| BSA | Fluka-Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Deisenhofen |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München |
| dNTP | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| Dextran 500 | GE Healthcare; München |
| EDTA | Serva Feinbiochemie GmbH und Co KG; Heidelberg |
| Ethanol _a <i>absolut</i> | Merck KGaA; Darmstadt |
| Ethidiumbromid | Serva Feinbiochemie GmbH und Co KG; Heidelberg |
| FKS - fetales Kälberserum | Bio Whittaker; Walkersville, USA |
| Glyzerin, 87% | C. Roth GmbH; Karlsruhe |
| Hefeextrakt | C. Roth GmbH; Karlsruhe |
| Isopropanol _a <i>absolut</i> | C. Roth GmbH; Karlsruhe |
| mAk CMV pp65 VIR-CMV C10/C11 | IQ-Products; Groningen, Niederlande |
| MgCl ₂ | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| Natriumacetat | Merck KGaA; Darmstadt |
| Natriumchlorid | Serva Feinbiochemie GmbH und Co KG; Heidelberg |
| Tris | Serva Feinbiochemie GmbH und Co KG; Heidelberg |

Marker

Tabelle 3.5: DNA-Marker

| Name | Herkunft |
|---|------------------------------|
| DNA Molecular-Weight Standard: PhiX 174 DNA/BsuRI (HaeIII), Marker IX | Fermentas GmbH; St. Leon-Rot |

Enzyme

Tabelle 3.6: Enzyme

| Name | Hersteller |
|---|---|
| Platinum [®] Taq DNA Polymerase T4-DNA-Ligase | Invitrogen GmbH; Karlsruhe Roche Diagnostics GmbH, Mannheim; Akti- vität 1 U/ μ l |
| BamH I | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim; Akti- vität 10 U/ μ l |
| EcoR I | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim; Akti- vität 10 U/ μ l |
| Hind III | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim; Akti- vität 10 U/ μ l |
| Sal I | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim; Akti- vität 10 U/ μ l |

Kitsysteme und gebrauchsfertige Komponenten

Tabelle 3.7: Verwendete Kitsysteme

| Name | Hersteller | Verwendung |
|---|--|--|
| QIAquick PCR Purifi- cation Kit | Qiagen GmbH, Hilden | Aufreinigung von PCR-Produkten |
| QIAquick Gel Extracti- on Kit | Qiagen GmbH, Hilden | Extraktion von DNA aus Agarosegelen |
| QIAamp DNA Mini Kit | Qiagen GmbH, Hilden | DNA-Isolierung aus Patientenproben |
| QIAamp DNA Blood Mini Kit | Qiagen GmbH, Hilden | DNA-Isolierung aus Patientenproben |
| <i>LightCycler</i> -FastStart- DNA Master Hybrid- ization Kit | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim | <i>LightCycler-RealTime-PCR</i> |
| Novagen Mobius Plas- mid Kit | Novagen GmbH, | Plasmidisolierung aus 25-100 ml Kultur (Midipräp) |
| DNA-Sequencing Kit | Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH; Freiburg | DNA-Sequenzierung |
| Dako ChemMate [™] Detection Kit APAAP, Mouse | DakoCytomation; Ber- lin | |

Lösungen und Puffersysteme

Tabelle 3.8: Lösungen und Puffer

| Lösung/Puffer | Zusammensetzung |
|--------------------------------|---|
| TBE-Puffer, 5fach konzentriert | 54 g Tris, 27,5 g Borsäure, 4,65 g EDTA ad 1 l Aqua bidest |
| Ladepuffer für DNA | 50 mg Bromphenolblau, 28 ml 10 mM EDTA pH 8.0, 13,76 ml Glycerin 87% |
| DEPC-Wasser | 1 ml einer 1:1000 Verdünnung von DEPC wurde zu 1l Aqua bidest gegeben und über Nacht unter dem Abzug gerührt und anschließend 3-fach autoklaviert |
| Natriumacetat, 3M | 246,12 g Natriumacetat ad 1 l Aqua bidest |
| LB-Medium (Luria Bertani) | 10 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl ad 1 l Aqua bidest |
| LB-Amp | LB-Medium + 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin |
| LB-/LB-Amp-Festmedium | Zugabe von 15 g/l Agar zu LB/LB-Amp, nach Sterilisation und ggf. Zugabe von Ampicillin wurde das Medium in Petrischalen gegossen |
| Hämolysepuffer | 830 mg NH_4Cl , 100 mg KHCO_3 ad 100 ml Aqua dest |
| Fixativ 1 | 5 % Paraformaldehyd, 2 % Sucrose in PBS |
| Fixativ 2 | 0,5 % NP40, 10 % Sucrose, 1% FKS in PBS |
| Waschlösung | 1 % FKS in PBS |
| Mini-Präp Lösung 1 | 100 $\mu\text{g/ml}$ RNaseA, 50 mM Tris/HCl, 10mM EDTA, pH 8,0 |
| Mini-Präp Lösung 2 | 200 mM NaOH, 1% SDS |
| Mini-Präp Lösung 3 | 3 M Kaliumacetat |

3.2 Methoden

3.2.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

DNA-Isolierung aus Patientenmaterial

Die DNA-Isolierung aus Patientenmaterialien erfolgte mit Hilfe des Qiagen QIAamp DNA Blood Mini Kits. Dabei wurde unter Berücksichtigung der verschiedenen Probenmaterialien die Anleitung des Herstellers verwendet.

Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarose-Gelen

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese können linearisierte DNA-Moleküle ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Aufgrund der negativen Ladung ihres Phosphatrückgrates wandern DNA-Moleküle im elektrischen Feld stets zur Anode. Dabei ist ihre Wanderungsgeschwindigkeit aufgrund des Widerstands der Agarose-Gelmatrix umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Länge.

Zur Auftrennung der DNA-Moleküle wurden Agarosegele verwendet, die 2 % Agarose enthielten. Um ein 2 %iges Gel herzustellen wurde pro 100 ml 1x TBE 2 g Agarose in der Mikrowelle aufgekocht. Nachdem die Lösung kurz abgekühlt war, wurden 0,02 % Ethidiumbromid hinzugefügt. Ethidiumbromid ist als interkalierende Substanz in der Lage, sich in die DNA-Doppelhelix einzulagern und die doppelsträngige DNA im UV-Licht sichtbar zu machen. Die Agaroselösung wurde in eine abgedichtete Gelkammer gegossen, die einen Kamm enthielt, der Taschen für die Proben aussparte. Nach abgeschlossener Polymerisierung konnte die Gelkammer in eine Elektrophoresekammer gestellt und mit 1x TBE überschichtet werden.

Die Taschen wurden mit den DNA-Proben (10 μ l DNA + 3 μ l DNA-Probenpuffer) beladen. Eine Tasche wurde mit einem standardisierten DNA-Größenmarker beladen, mit dessen Hilfe die Fragmentgrößen der aufgetrennten DNA abgeschätzt werden konnten.

Das Gel lief bei einer konstanten Spannung von 100 V für 60-90 Minuten und wurde unter UV-Licht ($\lambda = 365$ nm) fotografiert.

Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen

Die durch Ethidiumbromid-Interkalierung unter UV-Licht fluoreszierenden DNA-Banden wurden unter UV-Licht ($\lambda = 365$ nm) mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die ausgeschnittenen Gelstücke wurden gewogen und die enthaltene DNA mit Hilfe des Qiagen Gel-Extraktions-Kits gemäß dem Herstellerprotokoll extrahiert.

Die Extraktion und Reinigung der DNA-Fragmente basiert auf Lösung der Agarose und Adsorption der Nukleinsäuren in Gegenwart einer hohen Salzkonzentration an Partikel, die in eine Säule geladen sind. Die DNA wurde mit Aqua bidest. oder 1x TE-Puffer (pH 8,5) eluiert.

Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Aufzureinigende DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des Qiagen PCR Purification Kits dem Herstellerprotokoll entsprechend über Säulen aufgereinigt und mit 50 μ l sterilem Aqua bidest. oder TE-Puffer aus der Säulenmatrix eluiert.

Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgt durch photometrische Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm (entspricht dem Absorptionsmaximum) und 280 nm. Der Quotient aus diesen beiden Messdaten (OD_{260}/OD_{280}) erlaubt eine Aussage über den Reinheitsgrad der DNA. Er sollte zwischen 1,8 und 2,4 liegen. Die Konzentration der DNA wurde folgendermaßen berechnet:

$$C = OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50$$

OD: optische Dichte

C: Konzentration in mg/ml

Abbildung 3.2: Berechnung der DNA-Konzentration

Amplifikation von DNA-Fragmenten mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion

PCR zum Nachweis von Adenovirus DNA Der Nachweis von Adenovirus-DNA erfolgte mittels nested PCR. Hierbei wurde ein 440 Basenpaare großes DNA-Fragment aus der für das Hexonprotein kodierenden Gen-Region mit Hilfe eines ersten Primerpaares amplifiziert (siehe Tabelle 3.9). Mit diesem Amplifikat wurde eine zweite PCR-Reaktion mit einem zweiten Primerpaar durchgeführt. Die zweite PCR amplifizierte ein 330 Basenpaare großes DNA-Fragment, welches in dem ersten Amplifikat enthalten ist.

Der Reaktionsansatz für die erste PCR (45 μ l) enthielt 5 μ l 10 \times Reaktionspuffer der Taq-Polymerase, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP-Mix, 0,8 mM Primer ADH-01 und 1,2 mM Primer ADH-02 und 2 Einheiten Taq-Polymerase. Diesem Reaktionsansatz wurden 5 μ l DNA-Isolat zugefügt.

Der Reaktionsansatz für die zweite PCR (40 μ l) enthielt 5 μ l 10 \times Reaktionspuffer der Taq-Polymerase, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP-Mix, jeweils 0,8 mM Primer ADH-11 und ADH-12 und eine Einheit Taq-Polymerase. Diesem Reaktionsansatz wurden 10 μ l Amplifikat aus der ersten PCR zugefügt.

PCR zum Nachweis von Cytomegalievirus-DNA Der Nachweis von Cytomegalievirus-DNA erfolgte ebenfalls mittels nested PCR. Der Cytomegalievirus-Nachweis erfolgte über die Amplifizierung eines DNA-Fragments aus der Immediate-Early Gen-Region des Virus. Tabelle 3.9 stellt die verwendeten Primer dar.

Der Reaktionsansatz für die erste PCR (45 μ l) enthielt 5 μ l 10 \times Reaktionspuffer der Taq-Polymerase, 0,2 mM dNTP-Mix, jeweils 0,2 mM Primer D74-30 und D75-30 und 2 Einheiten Taq-Polymerase. Diesem Reaktionsansatz wurden 5 μ l DNA-Isolat zugefügt.

Der Reaktionsansatz für die zweite PCR (40 μ l) enthielt 5 μ l 10 \times Reaktionspuffer der Taq-Polymerase, 0,2 mM dNTP-Mix, jeweils 0,2 mM Primer D77-24 und D76-24 und eine Einheit Taq-Polymerase. Diesem Reaktionsansatz wurden 10 μ l Amplifikat aus der ersten PCR zugefügt.

PCR zum Nachweis von Parvovirus B19-DNA Auch zum Nachweis von Parvovirus B19 wurde eine nested PCR durchgeführt. Das zu amplifizierende DNA-Fragment aus der VP1-Genregion hat eine Größe von 290 Basenpaaren. Mit der zweiten PCR wurde aus diesem Amplifikat ein 173 Basenpaare großes Stück amplifiziert. Tabelle 3.9 zeigt die beiden Primerpaare.

Der Reaktionsansatz für die erste PCR (45 μ l) enthielt 5 μ l 10 \times Reaktionspuffer der Taq-Polymerase, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP-Mix, 0,2 mM Primer PVB 19-3 und PVB 19-4 und 2 Einheiten Taq-Polymerase. Diesem Reaktionsansatz wurden 5 μ l DNA-Isolat zugefügt.

Der Reaktionsansatz für die zweite PCR (40 μ l) enthielt 5 μ l 10 \times Reaktionspuffer der Taq-Polymerase, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP-Mix, jeweils 0,2 mM Primer PVB 19-1 und PVB 19-2 und eine Einheit Taq-Polymerase. Diesem Reaktionsansatz wurden 10 μ l Amplifikat aus der ersten PCR zugefügt.

Tabelle 3.9: Verwendete PCR-Primer

| Primer | Sequenz | Fragmentgröße |
|--|--------------------------------------|-------------------------|
| hAdv | | |
| ADH-01 | 5'-ACTACAAYATTggCTACCAgg-3' | 1. PCR 440 bp |
| ADH-02 | 5'-CAAAACATAAAgAAgKgTgggC-3' | |
| ADH-11 | 5'-AACTTCCAgCCCATGAgCMg-3' | 2. PCR 330 bp |
| ADH-12 | 5'-CTCAAAAgTCATgTCBAgCgC-3' | |
| HCMV | | |
| D74-30 | 5'-ggAgCACTgAggCAAgtTCTgCAATgCCgC-3' | 1. PCR 694 bp |
| D75-30 | 5'-TTTgAACgAgTgACCgACCATTgCAACgAg-3' | |
| D77-24 | 5'-CCCAATACACTTCATCTCCTCgAA-3' | 2. PCR 150 bp |
| D76-24 | 5'-CATAgAATCAAaggAgCACATgCTg-3' | |
| Parvovirus B19 | | |
| PVB19-3 | 5'-AgCATgTggAgTgAgggggC-3' | 1. PCR 290 |
| PVB19-4 | 5'-AAAgCATCaggAgCTATACTTCC-3' | |
| PVB19-1 | 5'-gCTAACTCTgTAACTTgTAC-3' | 2. PCR 173 bp |
| PVB19-2 | 5'-AAATATCTCCATggggTTGAG-3' | |
| R(A,g); Y(C,T); M(A,C); K(g,T); S(g,C); W(A,T); H(A,T,C); V(g,A,C); D(g,A,T); N(A,C,g,T) (IUB Code) | | |

Sequenzierung

Zur Sequenzierung von Plasmid-DNA oder PCR-Fragmenten wurde das Cycle Sequencing-Verfahren (Sears et al. 1992 [53], Slatko 1996 [94]) nach den Angaben des Herstellers (Applied Biosystems GmbH, Darmstadt) durchgeführt. Dazu wurde die DNA amplifiziert. Das PCR-Fragment wurde auf einem Agarosegel analysiert und mit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) direkt aufgereinigt oder nach präparativer Agarosegelelektrophorese aus dem Gel extrahiert (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Hilden). Danach erfolgte die Sequenzierung des Amplifikates.

Dazu wurde folgender Probenansatz pipettiert:

| | |
|-------------------|---|
| 7-x μl | DEPC Wasser |
| x μl | DNA (30-90 ng) |
| 1 μl | Primer (10 pmol) |
| 2 μl | Big-Dye-Terminator-Ready-Reaction-Mix (Applied Biosystems, Darmstadt) |

Dieser Ansatz wurde zunächst für zwei Minuten bei 95 °C denaturiert. Danach folgten 25 Zyklen mit einer Denaturierungsphase für zehn Sekunden bei 96 °C , die Primer-Hybridisierung für fünf Sekunden bei 50 °C und die Kettenverlängerung für vier Minuten bei 68 °C. Die DNA des Sequenzieransatzes wurde anschließend durch Präzipitation mit 2,5 Volumen Ethanol bei Raumtemperatur aufgereinigt. Abschließend erfolgte die Kapillarelektrophorese und automatische Sequenzauswertung mit dem Sequenzier-Gerät Prism 310 von Applied Biosystems.

3.2.2 Plasmidkonstruktion

Gewinnung der Inserts

Die DNA-Sequenzen, die in die Vektoren hineinkloniert werden sollten, wurden vorher mittels PCR amplifiziert. Die spezifischen Primer wurden an die gewünschten Restriktionsschnittstellen angehängt. Die Amplifikation wurde auf einem Agarose-Gel kontrolliert und die DNA aus dem Agarose-Gel extrahiert. Danach schloss sich ein Restriktionsverdau an.

Restriktionsverdau von DNA

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen spalten spezifische DNA-Sequenzen hydrolytisch, wobei entweder stumpfe (blunt-end) oder überhängende (sticky-end) Enden entstehen. Je nach Restriktionsenzym werden verschiedene Pufferbedingungen und optimale Temperaturen (üblicherweise 37 °C) benötigt. Folgende Reaktionsansätze wurden verwendet:

- analytischer Verdau (20 μl):
 - 1-3 μl Plasmid-DNA
 - 2 μl Reaktionspuffer
 - 1 μl Restriktionsenzym (bei Doppelverdau jeweils 0,5 μl)
 - mit Aqua bidest. auf 20 μl Gesamtvolumen auffüllen

- präparativer Verdau (50 μl):
 - 5-10 μl Plasmid-DNA
 - 5 μl Reaktionspuffer
 - 2 μl Restriktionsenzym (bei Doppelverdau jeweils 1 μl)
 - mit Aqua bidest. auf 20 μl Gesamtvolumen auffüllen

Der Ansatz wurde für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Vollständigkeit des Verdauens auf einem Agarose-Gel kontrolliert.

Ligation von DNA-Fragmenten

Die ATP-abhängige T4-DNA-Ligase ist in der Lage freie 3'-Hydroxylenden mit 5'-Phosphatenden von doppelsträngiger DNA zu verknüpfen, indem sie die Bildung einer Phosphodiesterbindung katalysiert.

Klonierungsvektor und Insert wurden vor der Ligation mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten und gereinigt.

- Ligationsansatz (20 μl)
 - 2 μl 10x Ligationspuffer, Roche Diagnostics
 - 1 μl T4-Ligase, Roche Diagnostics
 - 2 μl Vektor
 - 6 μl Insert-DNA
 - mit Aqua bidest. auf 20 μl Gesamtvolumen auffüllen

Die Reaktion erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur und wurde dann in ultrakompetente DH5 α transformiert.

Transformation kompetenter DH5 α

Als Transformation bezeichnet man in diesem Zusammenhang die Aufnahme von Plasmid-DNA durch kompetente Bakterien. Dabei können die Bakterien durch die Aufnahme des Plasmids einen Selektionsvorteil erhalten (z.B. Ampicillin Resistenzgen), so dass sie von den nichttransformierten Zellen unterschieden werden können.

50 μl Aliquots der ultrakompetenten DH5 α wurden langsam auf Eis aufgetaut und mit dem Ligationsansatz vorsichtig vermischt. Die Zellen wurden 30 Minuten auf Eis inkubiert, dann für 90 Sekunden einem Hitzeschock von 42 °C ausgesetzt und anschließend

30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen auf Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Kolonien ausgezählt und einzelne Kolonien in 3 ml LB-Medium überführt. Die Inkubation erfolgte wiederum über Nacht bei 37 °C im Luftschüttler.

Alkalische Lyse zur Plasmid-DNA Präparation aus E. coli (Mini-Präparation)

Diese Plasmidpräparation fand Anwendung, um den Klonierungserfolg im Restriktionsverdau zu überprüfen.

1,5 ml einer 3 ml Übernachtskultur transformierter Bakterien in TB+Amp.-Flüssigmedium wurden in ein Eppendorfgefäß überführt. In der Tischzentrifuge wurden die Bakterien bei 14000 rpm für 1 Minute pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 100 µl Lösung 1 resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Lösung 2 wurde das Gefäß mehrmals vorsichtig geschwenkt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor 150 µl von Lösung 3 zugegeben wurde. Nach mehrmaligem vorsichtigem Schwenken folgte eine 10-15 minütige Inkubation auf Eis mit anschließender Zentrifugation bei 14000 rpm für 10 Minuten. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert und die DNA durch Zugabe von 0,7 Vol.-% Isopropanol gefällt. Danach folgte eine Zentrifugation für 20 Minuten bei 4 °C mit 14000 rpm. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und getrocknet. Schließlich wurde das Pellet in ca. 50 µl sterilem Aqua bidest. resuspendiert.

Alkalische Lyse zur Plasmid-DNA Präparation aus E. coli (Midi-Präparation)

Diese Plasmidpräparation diente zur Gewinnung von Plasmid-DNA, die als Kopienstandard zur quantitativen PCR eingesetzt werden sollte.

Zur Isolation von Plasmid-DNA wurde eine 100 ml TB+Amp. Übernachtskultur in einem 250 ml Kolben angesetzt und bei 37 °C im Luftschüttler kultiviert. Die Midi-Präparation erfolgte unter Verwendung des Novagen Mobius 200 Plasmid Kits und wurde gemäß der Arbeitsanweisung des Herstellers durchgeführt.

Einstellung der Plasmid-Konzentration

Um das konstruierte Plasmid als Kopienstandard zu verwenden, musste noch die genaue Kopienzahl bestimmt und auf die gewünschte Konzentration (in Kopien / µl) eingestellt werden. Der DNA-Gehalt wurde photometrisch bestimmt, die Länge des Plasmids ermittelt und die Plasmid-Konzentration nach der Formel aus Abbildung 3.3 berechnet.

$$M = M_1 \times \text{Länge}$$

$$C = c \div M$$

$$C_n = C \times N_L$$

M : Molekulargewicht (g/mol)

M_1 : Molekulargewicht pro Basenpaar (g/mol)

c : Konzentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

C : Konzentration (mol/l)

C_n : Konzentration (Moleküle/l)

N_L : Avogadrozahl ($6,02 \times 10^{23}$)

Abbildung 3.3: Berechnung der Plasmid-Konzentration

3.2.3 pp65-Antigenämietest

Isolierung von Leukozyten

2,7 ml EDTA-Blut wurden mit 700 μl 5%-igem Dextran gemischt. Es erfolgte eine Sedimentation im Brutschrank bei 37°C für 20 min. Der Überstand wurde für 5 min bei 200 g zentrifugiert (Zentrifuge Hettich Universal 16). Das Zellsediment wurde anschließend in 3 ml Hämolysepuffer suspendiert und weitere 10 min inkubiert. Es folgte ein Waschgang mit PBS und anschließender Zentrifugation für 5 min bei 500 g. Der Überstand wurde verworfen und der Waschgang wiederholt. Abschließend erfolgte die Resuspendierung der Leukozyten in PBS.

Herstellung von Zytospinpräparaten

Es folgte eine Auszählung der Zellzahl in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer. Entsprechend der Auszählung wurden die Leukozyten mit PBS verdünnt, so dass eine Zellzahl von 2×10^6 Zellen/ μl resultierte. Pro Patient wurden zwei Zytospin-Präparate hergestellt, indem 200 μl der gewonnenen Leukozyten mit der Zentrifuge Cytospin-3 (Shandon; Pittsburgh, USA) bei 550 g auf Objektträger zentrifugiert wurden. Anschließend wurden die Objektträger luftgetrocknet.

Fixierung

Die trockenen Objektträger wurden fixiert, indem die aufzentrifugierten Zellen zuerst mit 150 μl Fixativ 1 10 min bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Danach erfolgte eine Waschung mit 1-%iger FKS in PBS und zweiminütiger Inkubation. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Danach wurden die Zellen mit 150 μl Fixativ 2 für 5 min inkubiert, anschließend dreimal gewaschen. Zuletzt erfolgte eine abschließende Waschung mit Aqua dest für 15 sec.

APAAP-Methode CMV pp65

Die fixierten und getrockneten Zytospinpräparate wurden mit TBS + Saponin gewaschen. Danach wurden die Zytospinpräparate mit 40 μl mAK pp65 für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und dreimal für jeweils 2 min mit TBS + Saponin gewaschen. Es folgte die Inkubation mit 50 μl Brücken-AK für 30 min und dreimalige Waschung für jeweils 2 min mit TBS + Saponin. Im Anschluß wurden 50 μl APAAP-Komplex (Dako-Cytomation, Berlin) zugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde dreimalig mit TBS für jeweils 2 min gewaschen, 100 μl Chromogenic Substrate zugegeben, nochmals dreimalig mit TBS für jeweils 2 min gewaschen, 100 μl Meyers Hämatoxylin zugegeben und 5 min inkubiert. Danach wurden die Zytospinpräparate ca. 2 min in einer Küvette mit Leitungswasser gewaschen. Abschließend erfolgte eine Einbettung in Glycerol-Gelatine.

Beurteilung

Zur Beurteilung der Präparate erfolgte die Zählung der angefärbten pp65-positiven Zellen unter dem Mikroskop.

3.2.4 Quantitative DNA-Bestimmung im LightCycler

Bei einem Reaktionsablauf im LightCycler wird zusätzlich zu den Komponenten, die für eine konventionelle PCR-Reaktion notwendig sind, ein Fluoreszenz-emittierendes System verwendet. Auf diese Weise ist es möglich einen Fluoreszenzanstieg als Ausdruck für den Fortschritt der PCR-Reaktion zu messen. Als Fluoreszenz-emittierendes System wurden Farbstoff-markierte Hybridisierungssonden verwendet.

Reaktionsansatz

LC DNA FastStart Master Hybridization Kit Dieses System besteht aus einem lyophilisierten Reaktionsgemisch, indem die DNA-Polymerase und die notwendigen dNTP's bereits enthalten sind, einem Gefäß mit DNase-freiem Wasser und einem Gefäß mit Magnesiumchlorid. Zuerst wurde das Reaktionsgemisch vorbereitet, indem es mit dem beiliegenden Wasser gemäß der Gebrauchsanleitung resuspendiert wurde. Diesem Reaktionsgemisch mussten noch die Primer- und Sondenpaare und die zu messende DNA-Probe hinzugefügt werden. Die einzige Möglichkeit dieses System zu beeinflussen, besteht in der Zugabe von MgCl_2 . Es wurde folgender Reaktionsansatz (20 μl) verwendet:

| | |
|----------------------|-------------------------------|
| 1,6 μl | MgCl_2 |
| 0,5 μM | sense Primer |
| 0,5 μM | antisense Primer |
| 0,2 μM | Sonde 1 (FITC) |
| 0,4 μM | Sonde 2 (<i>LC Red 640</i>) |
| 2,0 μl | LC FASTSTART Reaktionsgemisch |
| ad. 15 μl | H_2O |
| <hr/> | |
| + 5,0 μl | DNA |

Alternativer Reaktionsansatz Aus wirtschaftlichen Gründen wurde ein alternativer Reaktionsansatz verwendet, der aus verschiedenen Einzelkomponenten hergestellt wurde. Als DNA-Polymerase kam die Platinum-Taq von Invitrogen zum Einsatz, die von den getesteten Polymerasen als Einzige im LightCycler funktionierte. Im Allgemeinen wurde folgender Reaktionsansatz (20 μl) verwendet:

| | |
|----------------------|------------------------------------|
| 2,0 μl | 10 \times Puffer der Polymerase |
| 1,6 μl | MgCl ₂ (50 mM) |
| 0,5 μl | dNTP-Mix (10 mM) |
| 1,0 μl | BSA (100 ng/ μl) |
| 0,5 μM | sense Primer |
| 0,5 μM | antisense Primer |
| 0,2 μM | Sonde 1 (FITC) |
| 0,4 μM | Sonde 2 (<i>LC Red 640</i>) |
| 0,3 μl | PLATINUM-TAQ (5 U/ μl) |
| ad. 15 μl | H ₂ O |
| <hr/> | |
| + 5,0 μl | DNA |

Nach Zugabe der DNA wurden die Ansätze kurz zentrifugiert und in LightCycler Glaskapillaren überführt, danach für 2 min bei 3000 rpm zentrifugiert und anschließend in das *LightCycler* Probenkarussell eingebracht.

LightCycler-Protokoll

Bezüglich der Wahl der zyklusabhängigen Reaktionsbedingungen für die LightCycler PCR wurden die Empfehlungen aus der LightCycler Technical Note 3/99 berücksichtigt (siehe Tabelle 3.10).

Tabelle 3.10: Empfohlene Temperatur- und Zeitparameter für die *LightCycler* PCR

| | Temperatur [$^{\circ}\text{C}$] | Zeit [s] |
|---------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| Denaturierung | 95 | 0 |
| Annealing | abhängig von Primer ^a | 5-15 |
| Extension | 72 | abhängig von Amplikon ^b |

^a Die Annealingtemperatur sollte 5 $^{\circ}\text{C}$ unter der Primerschmelztemperatur liegen. ^b Die Extensionszeit richtet sich nach der Länge des Amplikons und wird nach der Formel $t = (bp \div 25)s$ berechnet.

Erstellen einer Standardkurve

Um eine genaue Quantifizierung unbekannter DNA durchzuführen, wurde eine Standardkurve benötigt. Hierzu wurden Plasmid-DNA verwendet, die die nachzuweisenden Gensequenzen enthielt. Diese Plasmid-DNA wurde photometrisch vermessen (siehe 3.2.1)

und die genaue Kopienzahl bestimmt (siehe 3.2.2). Danach wurde eine logarithmische Verdünnung des Plasmids in einem 0,25 pg/ μ l λ -DNA enthaltenden Tris-Puffer (pH = 8,5) hergestellt, die zur PCR eingesetzt wurde. Im Laufe der LightCycler-PCR wird der Crossing-Point der verschiedenen Verdünnungen bestimmt. Diese Crossing-Points werden in einem halblogarithmischen Koordinatensystem über die DNA-Konzentration aufgetragen. Die dabei entstehende Regressionsgerade kann zur Bestimmung der Konzentration unbekannter DNA-Proben herangezogen werden. Diese Regressionsgerade wurde mit Hilfe des Auswertungsprogramms DataAnalyse abgespeichert und für nachfolgende Versuche verwendet. Um die abgespeicherten Standardkurven verwenden zu können, mussten in jedem Versuch zwei definierte Standardproben mitgeführt werden. Anhand dieser wurde die abgespeicherte Regressionsgerade an den aktuellen Versuch angepasst.

DataAnalyse zur automatischen Datenauswertung

Zur computergestützten Datenauswertung wurde ein Computerprogramm in der frei erhältlichen Programmiersprache Java 1.4 erstellt. Als Arbeitsumgebung wurde die Entwicklungsumgebung Java SDK 1.4 verwendet. Die Java-Klasse Experiment stellt die Hauptfunktionen zur mathematischen Berechnung zur Verfügung. Mit Hilfe der Java-Klasse FileProcess werden die LightCycler-Format vorliegenden Datensätze eingelesen und die einzelnen Funktionen in der Java-Klasse Experiment gespeichert. Die Experiment-Klasse passt die einzelnen Funktionen automatisch an, so dass alle Funktionen eine gemeinsame Basislinie besitzen, und berechnet danach automatisch die CrossingPoints. Außerdem wird anhand der mitgeführten Standardwerte automatisch eine Standardkurve berechnet, mit deren Hilfe die Werte der einzelnen Funktionen ermittelt werden. Die so bearbeiteten Kurven können selbstverständlich abgespeichert werden. Außerdem ist es möglich, externe Standardkurven zu berechnen und in anderen Experimenten zu verwenden.

Im folgenden wird die Funktionsweise der wichtigsten Funktionen dargestellt.

Experiment.adjustBaseline() Diese Funktion soll alle Funktionen des LightCycler-Experiments auf eine Basislinie anpassen. Um dies zu erreichen wird der kleinste Fluoreszenzwert des gesamten Experiments berechnet und anschließend von sämtlichen Fluoreszenzwerten abgezogen.

Experiment.getCrossingPoints() Die Kinetik einer PCR-Reaktion lässt sich am besten durch eine Exponentialfunktion beschreiben. Diese Funktion erreicht allerdings eine

Plateauphase, sobald die Aktivität der Taq-Polymerase nachlässt. So ergibt sich ein s-förmiger Kurvenverlauf. Die Funktion `getCrossingPoints()` berechnet den Wendepunkt der Kurve. Der Wendepunkt einer Kurve bezeichnet genau den Punkt der Kurve, an dem ein Extremwert der Steigung der Kurve erreicht ist. An diesem Punkt ist entweder die Steigung maximal und fällt wieder ab oder die Steigung ist an diesem Punkt negativ und steigt danach langsam wieder an. In unserem Fall wird der Punkt benötigt, an dem die maximale Steigung erreicht wird. Dieser Punkt befindet sich in der log-linear-Phase der Kurve. In der Differentialrechnung berechnet man den Wendepunkt einer Funktion f indem man die zweite Ableitung der Funktion f'' gleich Null setzt. Besteht an dieser Nullstelle von f'' ein Maximum in der ersten Ableitung f' , so handelt es sich um den gesuchten Wendepunkt. Die Funktion `getCrossingPoints()` berechnet also für jede einzelne Funktion des Experiments die ersten beiden Ableitungen f' und f'' . Danach berechnet sie die Nullstellen der zweiten Ableitung und prüft ob es sich hierbei um ein Maximum in der ersten Ableitung handelt. Resultiert daraus ein Wendepunkt, ist der `CrossingPoint` der Kurve gefunden.

StandardKurve.StandardKurve(curveControl funktionen) Diese Funktion prüft ob in dem Experiment Standardwerte definiert sind und berechnet aus den Standardwerten eine Regressionsgerade.

Experiment.calculateValues() Mit Hilfe der berechneten Standardkurve werden durch diese Funktion die Werte der einzelnen Kurven berechnet.

Auswertung

Quantifizierung Zur Quantifizierung der Fluoreszenzdaten wurde der Quotient aus den beiden Messkanälen F2 und F1 ($F2/F1$) zu Grunde gelegt. Die Datensätze wurden in das Auswertungsprogramm `DataAnalyse` importiert. Die `CrossingPoints` der Kurven werden vom Auswertungsprogramm benutzerunabhängig berechnet. Die eigentliche Quantifizierung erfolgte anhand einer externen Standardkurve, die mittels eines mitgeführten Standards an das aktuelle Experiment angepasst wurde.

Schmelzpunktanalyse Die Schmelzpunktanalyse wurde mit der zum `LightCycler` mitgelieferten Software durchgeführt. Für die Schmelzpunktanalyse wurde die Kanaleinstellung F2 benutzt. Als Kalkulationsmethode wurde `Polynomial with Background Correction` eingestellt. Der `°C to Average`-Regler wurde auf einen Wert zwischen 6 und 8

eingestellt, so dass eine glatte Kurve resultierte. Danach berechnete die LightCycler-Software für jede Kurve automatisch den Schmelzpunkt.

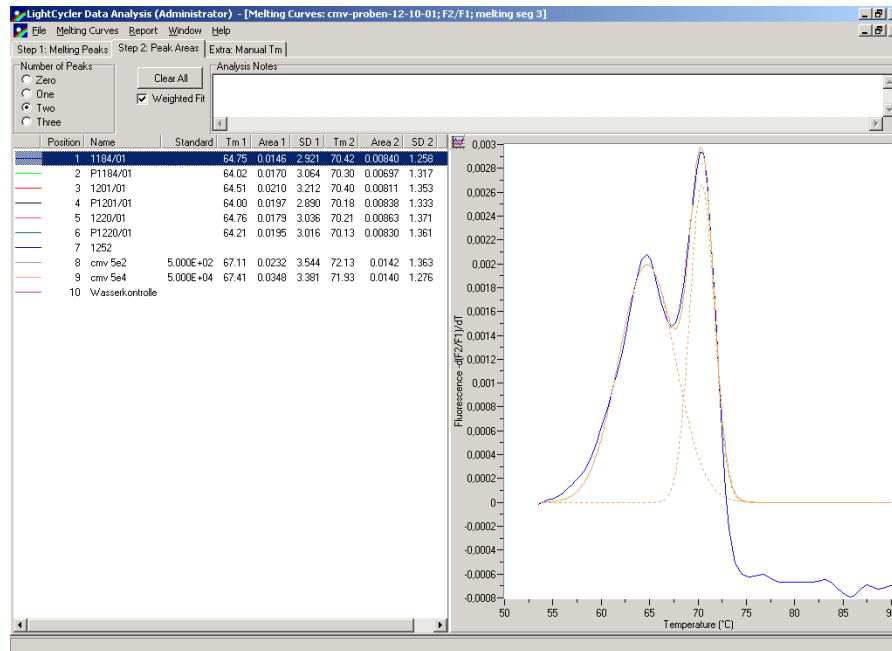


Abbildung 3.4: Schmelzpunktanalyse mit LightCycler Software Version 3.5

4 Ergebnisse

4.1 Vorbereitung der LightCycler-Technologie für die Virusdiagnostik

4.1.1 Herstellung von Referenz-DNA

Um eine quantitative Analyse der zu untersuchenden Proben zu ermöglichen, wurde Referenz-DNA als Kopienstandard benötigt. Hierfür wurden Genfragmente der entsprechenden Viren in pUC19 kloniert. Als Ergebnis der Arbeit konnten folgende Klonierungsstrategien erstellt werden:

Adenovirus Referenz-DNA

Ein ungefähr 544 Basenpaare großes Fragment, welches die zu amplifizierende Sequenz aus dem Hexon Gen von Adenovirus Typ 2 (GenBank Acc. No. J19066) enthält, wurde in ein pUC19-Plasmid kloniert. Mit dem Primerpaar AdenoXbaI und AdenoHindIII (siehe Tabelle 4.1) wurde dieses Fragment amplifiziert. Das so entstandene Amplifikat enthielt nun die artifizialen Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen XbaI und HindIII. Nach einem Doppelverdau mit beiden Restriktionsenzymen wurde dieses Produkt in einen ebenfalls doppelverdauten pUC19-Vektor ligiert. Das so entstandene Plasmid (pUC[HAdV2-hexon]) mit einer Gesamtlänge von 3201 Basenpaaren (siehe Abbildung 4.1) wurde in DH5 α transformiert. Nach Minipräparation der DNA wurde das Plasmid mittels Restriktionsverdau analysiert und zur Erhöhung der DNA-Ausbeute eine Midipräparation angeschlossen.

Aus der photometrischen Messung ergab sich eine Konzentration des Plasmids von 2,175 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Das entspricht einer Konzentration von $6,29 \times 10^{17}$ Plasmiden pro Mikroliter. Das Plasmid wurde auf eine Konzentration von 5×10^9 Plasmidkopien pro Mikroliter eingestellt. Danach wurde eine Verdünnungsreihe erstellt, die unter Berücksichtigung des konventionellen PCR-Protokolls amplifiziert wurde. Das Ergebnis wurde gelelektrophoretisch analysiert (siehe Abbildung 4.2).

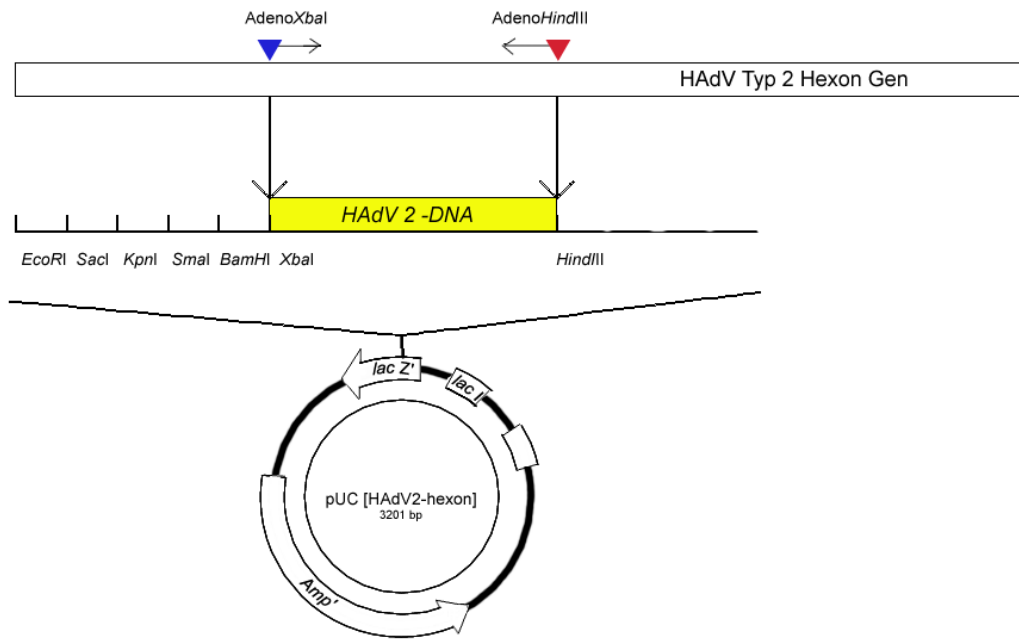


Abbildung 4.1: Darstellung der Klonierungsstrategie zur Herstellung des Referenzkonstruktes pUC[HAdV2-hexon]. Die artifiziell eingebrachten Schnittstellen sind mit Dreiecken dargestellt.

CMV Referenz-DNA

Zur Gewinnung von Referenz-DNA für CMV wurde aus humanen Fibroblasten nach Infektion mit CMV DNA extrahiert, die ebenfalls in ein pUC19-Plasmid kloniert wurde. Zur Amplifizierung der DNA wurde das Primerpaar CMVEcoRI und CMVHindIII verwendet (siehe Tabelle 4.1), das die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme EcoRI und HindIII in das entstehende Produkt einbauen sollte (siehe Abbildung 4.3). Das entstandene Amplifikat wurde einem Doppelverdau mit beiden Restriktionsenzymen unterzogen und in das ebenfalls doppelverdaute pUC19-Plasmid ligiert. Nach Transformation in DH5 α und Minipräparation der DNA wurde eine Analyse mittels Restriktionsverdau durchgeführt und eine Midipräparation angeschlossen.

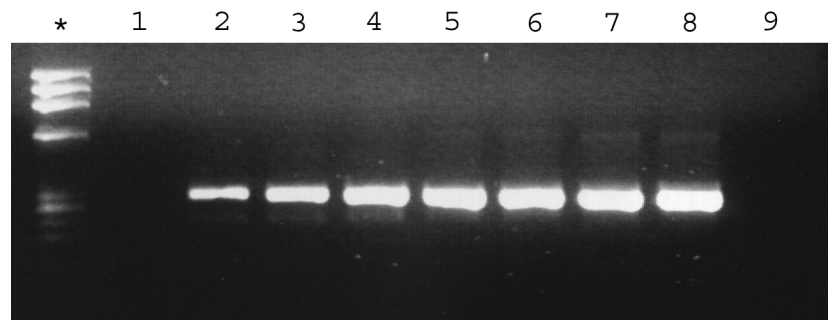


Abbildung 4.2:]

Plasmid-Verdünnungsreihe. *: Standard, 1: pUC[HAdV2-hexon] $2,5 \times 10^1$ Kopien, 2: pUC[HAdV2-hexon] $2,5 \times 10^2$, 3: pUC[HAdV2-hexon] $2,5 \times 10^3$, 4: pUC[HAdV2-hexon] $2,5 \times 10^4$, 5: pUC[HAdV2-hexon] $2,5 \times 10^5$, 6: pUC[HAdV2-hexon] $2,5 \times 10^6$ Kopien, 7: pUC[HAdV2-hexon] $2,5 \times 10^7$ Kopien, 8: pUC[HAdV2-hexon] $2,5 \times 10^8$ Kopien, 9: Wasserkontrolle

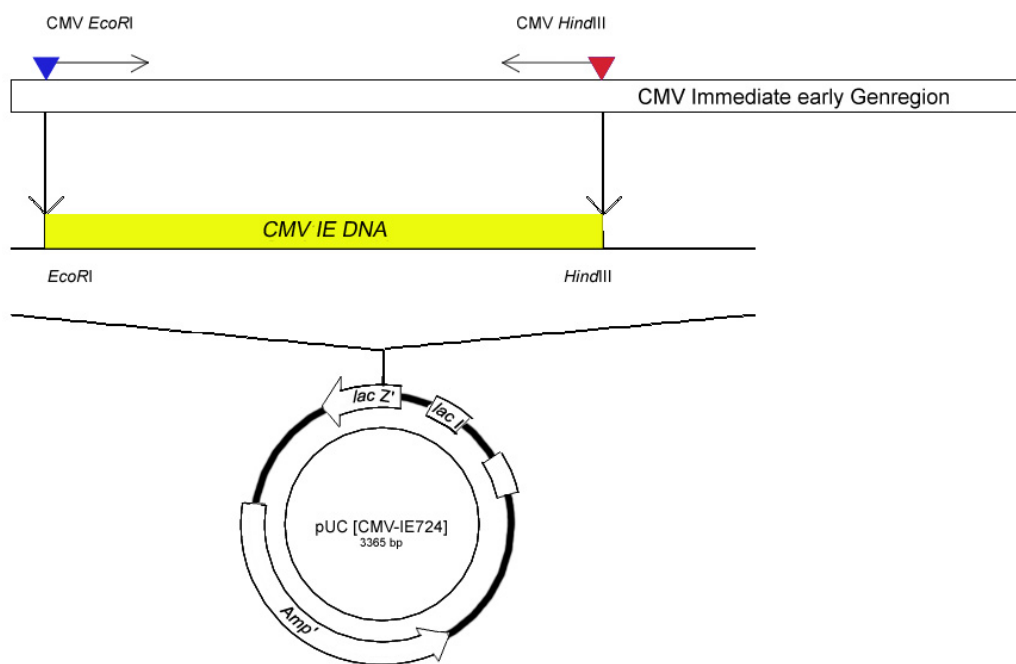


Abbildung 4.3: Darstellung der Klonierungsstrategie zur Herstellung des Referenzkonstruktes pUC[CMV-IE724]. Die artifizell eingebrachten Schnittstellen sind mit Dreiecken dargestellt.

Parvovirus B19 Referenz-DNA

Als Referenz-DNA für den Nachweis von Parvovirus B19 wurde ein Fragment aus der VP1 Region des Virus (GenBank Acc. No. M13178) in pUC19 kloniert. Das Insert wurde aus einer positiven Patientenprobe gewonnen. Als Primer wurden ParvoEcoRI und ParvoSalI verwendet (siehe Tabelle 4.1, die die entsprechenden Schnittstellen in das resultierende Ampifikat einbringen sollten (siehe Abbildung 4.4). Dieses entstandene Amplifikat wurde nach einem Doppelverdau mit den beiden Restriktionsenzymen in das ebenfalls doppelverdaute Plasmid ligiert. Nach anschließender Transformation und Analyse der durch Minipräparation gewonnenen DNA wurde die Ausbeute durch Midipräparation erhöht.

Mit Hilfe dieser Klonierungsstrategie wurde das Plasmid pUC[B19 VP1] erstellt. Abbildung 4.5 zeigt eine Verdünnungsreihe des Plasmids pUC[B19 VP1] nach konventioneller Parvovirus B19-PCR. Die photometrische Messung des Plasmids ergab eine DNA-Konzentration von $0,3625 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Das entspricht einer Konzentration von $1,118 \times 10^{11}$ Plasmidmolekülen pro Microliter. Eine logarithmische Verdünnungsreihe wurde gelelektrophoretisch analysiert.

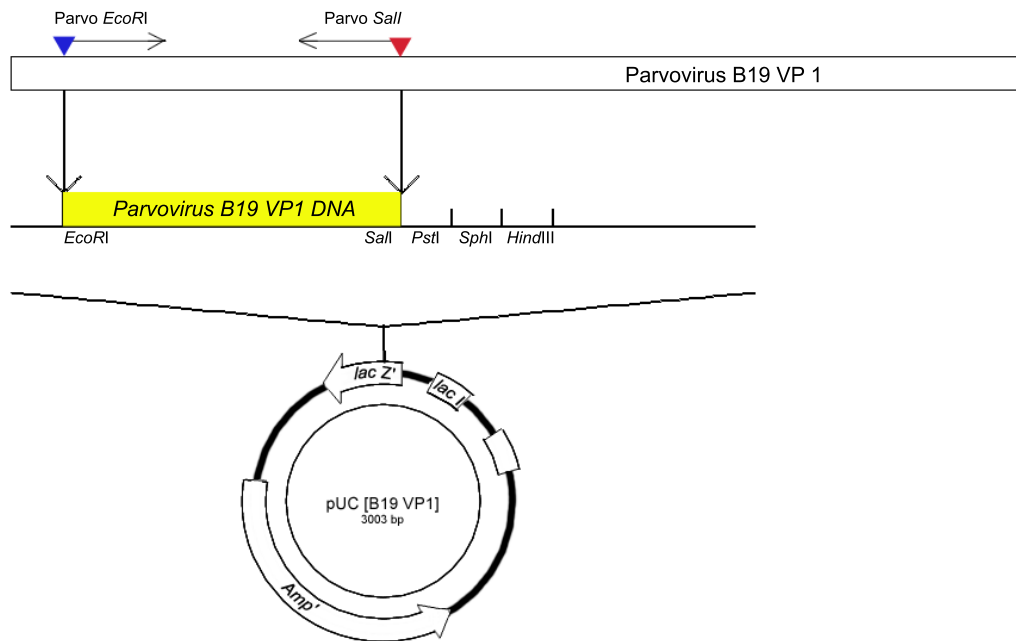


Abbildung 4.4: Darstellung der Klonierungsstrategie zur Herstellung des Referenzkonstruktes pUC[B19 VP1]. Die artifiziell eingebrachten Schnittstellen sind mit farbigen Dreiecken dargestellt.

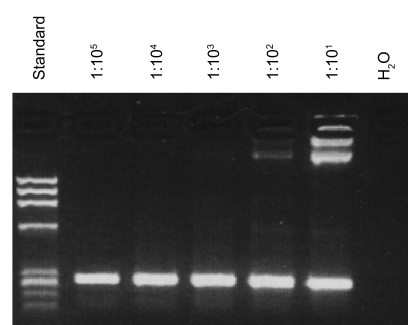


Abbildung 4.5: Verdünnungsreihe von pUC[B19 VP1].

Tabelle 4.1: Klonierungsprimer

| Bezeichnung | Sequenz | Enzym |
|-------------------------|--|-----------------|
| Adenovirus | | |
| Adeno <i>Xba</i> I | 5'-gATCCATCTAgAAACATgACCAAggACTggTT-3' | <i>Xba</i> I |
| Adeno <i>Hind</i> III | 5'-gATCCAAAgCTTAaggTACACggTCTCgATg-3' | <i>Hind</i> III |
| Cytomegalievirus | | |
| CMV <i>Eco</i> RI | 5'-gATCCAgAATTCggAgCACTgAggCAAgtTCTgCAA-3' | <i>Eco</i> RI |
| CMV <i>Hind</i> III | 5'-gATCCAAAgCTTTTTgAACgAgTgACCgACCATTgC-3' | <i>Hind</i> III |
| Parvovirus B19 | | |
| Parvo <i>Eco</i> RI | 5'-gATCCAgAATTCAgCATgTggAgTgAgggggC-3' | <i>Eco</i> RI |
| Parvo <i>Sal</i> I | 5'-gATCCAgTCgACAAAgCATCaggAgCTATACTTCC-3' | <i>Sal</i> I |

4.1.2 Auswahl der Sonden und Primer

Der Auswahl der Sonden und Primer wurden jeweils die entsprechenden Einträge in der GenBank zu Grunde gelegt. Tabelle 4.2 listet die einzelnen Primer und Sonden sortiert nach den nachzuweisenden Viren auf und bietet einen Überblick über die Nukleotidsequenzen. Nachfolgend werden die Ergebnisse der Sonden- und Primerauswahl für die einzelnen Viren aufgezeigt.

Quantifizierung von Adenovirus DNA mittels Hybridisierungssonden

Die Auswahl der Primer für die Realtime-PCR erfolgte, analog zu der konventionellen PCR, aus dem für das Hexonprotein kodierenden Genbereich des Virus. Abbildung 4.6 zeigt die Sequenzanalysen von verschiedenen Patienten und Probenmaterialien im Bereich der inneren Primer ADH-11 und ADH-12 (Vergleiche Tabelle) der konventionellen PCR.

In Abbildung 4.7 ist das endgültige Design der Sonden im Vergleich zu den für die Patienten nach Transplantation relevanten AdV-Typen 1, 3, 5, 11, 34, 35 und 41 dargestellt.

Abbildung 4.8 zeigt als Ergebnis der Sequenzdaten- und GenBank-Analyse die Platzierung der Primer Adeno sense und Adeno antisense und Sonden Adeno 3-FL und Adeno 5-LC im Adenovirus-Hexongen am Beispiel von AdV 2 (GenBank Acc. No. J19066). Im LightCycler wird ein 392 bp großes Fragment aus dem Hexongen amplifiziert (Basen 2437-2828 /J19066). Die Sonden Adeno 3-FL und Adeno 5-LC hybridisieren in diesem Bereich mit dem antisense-Strang (Basen 2742-2766 und 2768-2790 /J19066).

| | | | | | | | |
|----------------|------------|-------------|-------------|------------|------------|-------------|------|
| gb J01966 2581 | GCTACAAGGA | CCGCATGTAC | TCCTTCTTTA | GAAACTTCCA | GCCCATGAGC | CGTCAGGTGG | |
| S.E. E-Blut | | | | | | | TGG |
| S.E. Leber | | | | | | | GG |
| S.E. Tubus | | | | | | | GTGG |
| K. Stuhl | | | | | | | |
| H.S. Trach. | | | | | | | |
| H.S. E-Blut | | | | | | | |
| H.S. Urin | | | | | | | |
| gb J01966 2641 | TGGATGATAC | TAAATACAAG | GACTACCAAC | AGGTGGGCAT | CCTACACCAA | CACAACAAC | |
| S.E. E-Blut | TGGCAGATAC | CAAATACAAG | GACTACCAAC | AGGTGGGCAT | CCTCACCAG | CACAATAACT | |
| S.E. Leber | TGGACGATAC | CAAATACAAG | GACTACCAAC | AGGTGGGCAT | CCTCACCAG | CACAATAACT | |
| S.E. Tubus | TGGACGATAC | CAAATACAAG | GCTACCAAC | AGGTGGGCAT | CCTCACCAG | CACAATAACT | |
| K. Stuhl | GACGATAC | TAAATACAAG | GAGTACAGC | AGGTGGAAAT | TCTTACCAG | CATAACAAC | |
| H.S. Trach. | | | TTCAGG | CCGTGGCAT | ACCCTATCAA | CACAACAAC | |
| H.S. E-Blut | | G CAAATACAA | GACTTCAAGG | CCGTGGCAT | ACCCTATCAA | CACAACAAC | |
| H.S. Urin | | | | | | | |
| gb J01966 2701 | CTGGATTTGT | TGGCTACCTT | GCCCCACCA | TGCGCAAGG | ACAGGCCTAC | CCTGCTAACT | |
| S.E. E-Blut | CTGGCTTTGT | TGGTTACCTC | GCTCCCACCA | TGCGAGAGGG | ACAGGCCTAC | CCGCGCAACT | |
| S.E. Leber | CTGGCTTTGT | TGGTTACCTC | GCTCCCACCA | TGCGAGAGGG | ACAGGCCTAC | CCGCGCAACT | |
| S.E. Tubus | CTGGCTTTGT | TGGTTACCTC | GCTCCCACCA | TGCGAGAGGG | ACAGGCCTAC | CCGCGCAACT | |
| K. Stuhl | CAGGATTCGT | AGGCTACCTC | GCTCCCACCA | TGCGCGAGGG | ACAGGCCTAC | CCGCGCAACT | |
| H.S. Trach. | CTGGCTTTGT | GGTTACATG | GCTCCCACCA | TGCGCAAGG | TCAACCTAT | CCGCGCTAACT | |
| H.S. E-Blut | CTGGCTTTGT | GGTTACATG | GCTCCCACCA | TGCGCAAGG | TCAACCTAT | CCGCGCTAACT | |
| H.S. Urin | | | | | | CCGCGCTAACT | |
| gb J01966 2761 | TCCCCTATCC | GCTTATAGGC | AAGACCGCAG | TTGACAGCAT | TACCCAGAAA | AAGTTTCTTT | |
| S.E. E-Blut | TCCCCTACC | GCTTATAGGC | AAGACCGCG | TTGACAGTAT | TACCCAGAAA | AAGTTTCTTT | |
| S.E. Leber | TCCCCTACC | GCTTATAGGC | AAGACCGCG | TTGACAGTAT | TACCCAGAAA | AAGTTTCTTT | |
| S.E. Tubus | TCCCCTACC | GCTTATAGGC | AAGACCGCG | TTGACAGTAT | TACCCAGAAA | AAGTTTCTTT | |
| K. Stuhl | TGCCCTACC | ACTAATAGGC | AAACCPCGG | TTGACAGTAT | TACCCAGAAA | AAGTTTCTTT | |
| H.S. Trach. | ATCCCTATCC | ACTCATTTGA | ACAACITGCCG | TAAATAGTGT | TACCCAGAAA | AAGTTCTTGT | |
| H.S. E-Blut | ATCCCTATCC | ACTCATTTGA | ACAACITGCCG | TAAATAGTGT | TACCCAGAAA | AAGTTCTTGT | |
| H.S. Urin | ATCCCTATCC | ACTCATTTGA | ACAACITGCCG | TAAATAGTGT | TACCCAGAAA | AAGTTCTTGT | |
| gb J01966 2821 | GCGATCGCAC | CCTTTGGCGC | ATCCCATCT | CCAGTAACTT | TATGTCCATG | GGCGCACTCA | |
| S.E. E-Blut | GCGACCGCAC | CCTTTGGCGC | ATCCCATCT | CCAGTAACTT | TATGTCCATG | GGTGCCTCA | |
| S.E. Leber | GCGACCGCAC | CCTTTGGCGC | ATCCCATCT | CCAGTAACTT | TATGTCCATG | GGTGCCTCA | |
| S.E. Tubus | GCGACCGCAC | CCTTTGGCGC | ATCCCATCT | CCAGTAACTT | TATGTCCATG | GGTGCCTCA | |
| K. Stuhl | GCGATCGCAC | CCTTTGGCGC | ATCCCATCT | CCAGTAACTT | TATGTCCATG | GGCGCACTCA | |
| H.S. Trach. | GTGACAGAAC | CATGAGGCGC | ATACCGTTCT | CGAGCAACTT | CATGTCTATG | GGGCGCTAA | |
| H.S. E-Blut | GTGACAGAAC | CATGAGGCGC | ATACCGTTCT | CGAGCAACTT | CATGTCTATG | GGGCGCTAA | |
| H.S. Urin | GTGACAGAAC | CATGAGGCGC | ATACCGTTCT | CGAGCAACTT | CATGTCTATG | GGGCGCTAA | |
| gb J01966 2881 | CAGACCTGGG | CCAAAACCTT | CTCTACGCCA | ACTCCGCCCA | CGCGCTAGAC | ATGACTTTTG | |
| S.E. E-Blut | CAGACCTGGG | CCAAAACCTT | CTCTAGCAA | ACTCCGCCCA | CGCGCTAGAC | ATG | |
| S.E. Leber | CAGACCTGGG | CCAAAACCTT | CTCTAGCAA | ACTCCGCCCA | CGCGCTAGAC | ATGACTTTTG | |
| S.E. Tubus | CAGACCTGGG | CCAAAACCTT | CTCTAGCAA | ACTCCGCCCA | CGCGCTAGAC | ATGACTTTTG | |
| K. Stuhl | CAGACCTGGG | CCAAAACCTT | CTCTACGCCA | ACTCCGCCCA | CGCGCTAGAC | ATGACTTTTG | |
| H.S. Trach. | CAGACTTGGG | ACAGAAATATG | CTCTAGCCA | ACTCAGCTCA | TGCGCTGGAC | ATGACTTTTG | |
| H.S. E-Blut | CAGACTTGGG | ACAGAAATATG | CTCTAGCCA | ACTCAGCTCA | TGCGCTGGAC | ATGACTTTTG | |
| H.S. Urin | CAGACTTGGG | ACAGAAATATG | CTCTAGCCA | ACTCAGCTCA | TGCGCTGGAC | ATGACTTTTG | |

Abbildung 4.6: Sequenzierung verschiedener AdV-positiver Patientenmaterialien.
E-Blut: EDTA-Blut, Leber: Lebergewebe, Trach.: Trachealsekret, Tubus: Tubusabstrich

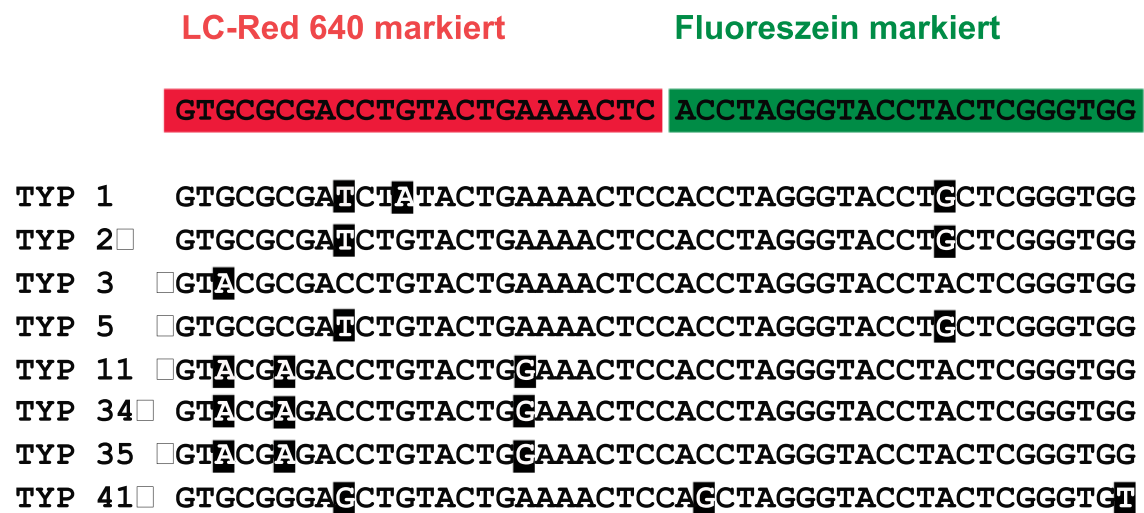


Abbildung 4.7: **Sondendesign.** Design der AdV-Hybridisierungssonden für die LightCycler-PCR. Die Sequenzen der Sondenbindungsregion der für Transplantationsempfänger relevanten AdV-Typen 1, 2, 3, 5, 11, 34, 35 und 41 sind dargestellt. Die Unterschiede zu den Sondensequenzen sind schwarz unterlegt.

Tabelle 4.2: Verwendete Primer und Sonden

| Bezeichnung | Sequenz | GC-Gehalt | T _m |
|-------------------------|---|-----------|----------------|
| Adenovirus | | | |
| <i>Primer</i> | | | |
| Adeno sense | 5'-AACTTCCAgCCCATgAgCCg-3' | 60,0 % | 63,3°C |
| Adeno anti-sense | 5'-CggACCACgTCgAAgACTTC-3' | 60,0 % | 59,4°C |
| <i>Sonden</i> | | | |
| Adeno 3-FL | 5'-ggTgggCTCATCCATgggATCCA-FITC-3 | 60,9 % | 67,6°C |
| Adeno 5-LC | 5'-LC Red640-CTCAAAAgTCATgTCCAgCgCgTg-P-3 | 54,2 % | 66,0°C |
| Cytomegalievirus | | | |
| <i>Primer</i> | | | |
| D77-24 | 5'-CCCAATACACTTCATCTCCTCgAA-3' | 45,8 % | 58,8°C |
| D76-24 | 5'-CATAgAATCAAaggAgCACATgCTg-3' | 45,8 % | 58,3°C |
| <i>Sonden</i> | | | |
| CMV 3-FL | 5'-AAggCATTCTgCAAACATCCTCCCATCATATT-FITC-3' | 40,6 | 68,4°C |
| CMV 5-LC | 5'-LC Red640-CgCCAgTgAATTTCTCTTCCgTCTggg-P-3' | 55,6 | 69,6°C |
| Parvovirus B19 | | | |
| <i>Primer</i> | | | |
| PVL-1 | 5'-CTCTgTAACTTgTACATTTTCCAgA-3' | 36,0 % | 53,1°C |
| PVL-2 | 5'-AAATATCTCCATggggTTgAg-3' | 42,9 % | 53,5°C |
| <i>Sonden</i> | | | |
| Parvo 3-FL | 5'-ATAAggTgTTTTCTCCCgCAgCgAgT-FITC-3' | 50,0 % | 66,7°C |
| Parvo 5-LC | 5'-gCTgCCACAATgCCAgTggAAAg-P-3' | 56,6 % | 67,8°C |

```

2365  AACTACAATA TTGGCTACCA GGGCTTCTAC ATTCCAGAAA GCTACAAGGA
      TTGATGTTAT AACCGATGGT CCCGAAGATG TAAGGTCTTT CGATGTTCTT
                Adeno sense →
2415  CCGCATGTAC TCGTTCTTCA GAAACTTCCA GCCCATGAGC CGGCAAGTGG
      GCGGTACATG AGCAAGAAGT CTTTGAAGGT CGGGTACTCG GCCGTTACC
2465  TTGACGATAC TAAATACAAG GAGTATCAGC AGGTTGGAAT TCTTACCAG
      AACTGCATG ATTTATGTTT CTCATAGTCG TCCAACCTTA AGAAGTGGTC
2515  CATAACAACCT CAGGATTCGT AGGCTACCTC GCTCCCACCA TGC GCGAGGG
      GTATTGTTGA GTCCTAAGCA TCCGATGGAG CGAGGGTGGT ACGCGCTCCC
2565  ACAGGCTTAC CCCGCCAACG TGCCCTACCC ACTAATAGGC AAAACCGCGG
      TGTCGAATG GGGCGGTTGC ACGGGATGGG TGATTATCCG TTTTGCGGCC
2615  TTGACAGTAT TACCCAGAAA AAGTTTCTTT GCGATCGCAC CCTTTGGCGC
      AACTGTCATA ATGGGTCTTT TTCAAAGAAA CGCTAGCGTG GGAAACCGCG
2665  ATCCCATTTCT CCAGTAACTT TATGTCCATG GGCGCACTCA CAGACCTGGG
      TAGGGTAAGA GGTCAATTGAA ATACAGGTAC CCGCGTGAGT GTCTGGACCC
2715  CCAAAACCTT CTCTACGCCA ACTCCGCCCA CGCGCTAGAC ATGACTTTTG
      GGTTTTGGAA GAGATGCGGT TGAGGCG GGT GCGCGATCTG TACTGAAAAC
                Adeno 5'-LC
2765  AGGTGGATCC CATGGACGAG CCCACCCTTC TTTATGTTTT GTTGAAGTC
      TCCACCTAGG GTACCTGCTC GGGTGG GAAG AAATACAAAA CAAACTTCAG
                Adeno 3'-FL ←
2815  TTTGACGTGG TCCGTGTGCA CCAGCCGCAC CGCGGCGTCA TCGAGACCGT
      AAACCTGCACC AGGCACACGT GGTGCGCGTG GCGCCGCAGT AGCTCTGGCA
                Adeno antisense
2865  GTACCTGCGC ACGCCCTTCT CGGCCGGCAA CGCCACAACA TAA
      CATGGACGCG TGCGGGAAGA GCCGCGCGTT GCGGTGTTGT ATT

```

Abbildung 4.8: Adenovirus LightCycler- PCR: Platzierung der Sonden und Primer im Adenovirus Hexon-Gen (GeneBank-Eintrag J19066).

Quantifizierung von CMV-DNA mittels Hybridisierungssonden

Die Platzierung der Primer und Sonden für die CMV LightCycler-PCR erfolgte in der immediate early-Genregion des Virus. Abbildung 4.9 zeigt die genaue Lokalisierung der Sonden CMV 3-FL und CMV 5-LC und Primer D76-24 und D77-24 im Bezug auf die immediate early-Genregion (GenBank Acc. No. X17403). Im LightCycler wurde ein 150 bp großes Fragment amplifiziert (Basen 172041-172190 /X17403). Die Sonden CMV 3-FL und CMV 5-LC hybridisieren in diesem Bereich mit dem sense-Strang (Basen 171093-172124 und 172130-172156 /X17403).

```

171841  AACTCTATAT TCCTGTAGCA CATATACATC ATCTTTCTCC TAAGTTCATC
        TTGAGATATA AGGACATGCT GTATATGTAG TAGAAAGAGG ATTCAAGTAG

171891  CTTTTTAGCA CGGGCCTTAG CCTGCAGTGC ACCCCCCAAC TTGTTAGCGG
        GAAAAATCGT GCCCGGAATC GGACGTCACG TGGGGGGTTG AACCAATCGCC

171941  CGCCCTTGCT CACATCATGC AGCTCCTTAA TACAAGCCAT CCACATCTCC
        GCGGGAACGA GTGTAGTACG TCGAGGAATT ATGTTCCGGTA GGTGTAGAGG

171991  CGCTTATCCT CAGGTACAAT GTAGTTCTCA TACATGCTCT GCATAGTTAG
        GCGAATAGGA GTCCATGTTA CATCAAGAGT ATGTACGAGA CGTATCAATC
        D77-24
172041  <----->
        CCCAATACAC TTCATCTCCT CGAAAGGCTC ATGAACCTTA TCTAAGATAT
        GGGTTATGTG AAGTAGAGGA GCTTTCCGAG TACTTGGAAT AGATTCTATA
        CMV 3 FL
171091  CT AAGGCATT CTGCAAAACAT CCTCCCATCA TATTAAAGGC GCCAGTGAAT
        GATTCCGTAA GACGTTTGTA GGAGGGTAGT ATAATTTCCG CGGTCACTTA
        CMV 5 LC
172141  TTCTCTTCCG TCTGGG TATA TTTTTTCAGC ATGTGCTCCT TGATTCTATG
        AAGAGAAGGC AGACCCATAT AAAAAAGTCG TACACGAGGA ACTAAGATAC
        <----->
        D76-24
172191  CCGCACCATG TCCACTCGAA CCTTAATCTG TTTGACTGTA GAGGAGGATA
        GGCGTGGTAC AGGTGAGCTT GGAATTAGAC AACTGACAT CTCTCTCTAT

172241  ACAACACATA TAAGTATCCG TCCTCCTGAC TCATTTATCG CTATCTCGAT
        TGTGTGTAT ATTCATAGGC AGGAGGACTG AGTAAATAGC GATAGAGCTA

172291  GCCCCGCTCA CATGCAAGAG TTAATCTTTA CTCTATCTGA CATACACAAG
        CGGGGCGAGT GTACGTTCTC AATTAGAAAT GAGATAGACT GTATGTGTTC

172341  TAAATCCACG TCCCATGCAG GTTAGTATAC ATCACATACA TGTCAACAGA
        ATTTAGGTGC AGGGTACGTC CAATCATATG TAGTGTATGT ACAGTTGTCT

```

Abbildung 4.9: CMV-LightCycler-PCR: Platzierung der Sonden CMV 3-FL und CMV 5-LC und Primer D76-24 und D77-24 im *immediate early*-Genbereich von CMV (GenBank-Eintrag X17403).

Quantifizierung von Parvovirus B19 DNA mittels Hybridisierungssonden

Abbildung 4.10 stellt die Platzierung der Primer PVL-1 und PVL-2 und Sonden Parvo 3-FL und Parvo 5-LC der von uns gewählten Parvovirus B19-LightCycler-PCR, in Bezug auf die Gensequenz der VP1-Region des Virus (GenBank Acc. No. M13178) dar. In der PCR-Reaktion wird ein 168 bp großes Fragment aus der VP1-Region des Virus amplifiziert (Basen 3226-3393 /M13178). Die Sonden Parvo 3-FL und Parvo 5-LC hybridisieren in diesem Bereich mit dem sense-Strang (Basen 3285-3310 und 3312-3334 /M13178).

| | | | | | |
|------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| 3101 | AACGCCTCAG | AAAAATACCC | AAGCATGACT | TCAGTTAATT | CTGCAGAAGC |
| | TTGCGGAGTC | TTTTTATGGG | TTCGTACTGA | AGTCAATTAA | GACGTCTTCG |
| 3151 | CAGCACTGGT | GCAGGAGGGG | GGGGCAGTAA | TTCTGTCAAA | AGCATGTGGA |
| | GTCGTGACCA | CGTCTCCTCC | CCCCGTCATT | AAGACAGTTT | TCGTACACCT |
| | | | PVL 19-1 → | | |
| 3201 | GTGAGGGGGC | CACTTTTAGT | GCTAACTCTG | TAAGTTGTAC | ATTTTCCAGA |
| | CACTCCCCCG | GTGAAAATCA | CGATTGAGAC | ATTGAACATG | TAAAAGGTCT |
| | | | | Parvo 3-FL | |
| 3251 | CAGTTTTTAA | TTCCATATGA | CCCAGAGCAC | CATTATAAGG | TGTTTTCTCC |
| | GTCAAAAATT | AAGGTATACT | GGGTCTCGTG | GTAATATTCC | ACAAAAGAGG |
| | | | Parvo 5-LC | | |
| 3301 | CGCAGCGAGT | AGCTGCCACA | ATGCCAGTGG | AAAGGAGGCA | AAGGTTTGCA |
| | GCGTCGCTCA | TCGACGGTGT | TACGGTCACC | TTTCCTCCGT | TTCCAAACGT |
| 3351 | CCATCAGTCC | CATAATGGGA | TACTCAACCC | CATGGAGATA | TTTAGATTTT |
| | GGTAGTCAGG | GTATTACCTT | ATGAGTTGGG | GTACCTCTAT | AAATCTAAAA |
| | | | ← PVL 19-2 | | |
| 3401 | AATGCTTTAA | ATTTATTTTT | TTCACCTTTA | GAGTTTCAGC | ACTTAATTGA |
| | TTACGAAATT | TAAATAAAAA | AAGTGGAAT | CTCAAAGTCG | TGAATTAACT |
| 3451 | AAATTATGGA | AGTATAGCTC | CTGATGCTTT | AACTGTAACC | ATATCAGAAA |
| | TTAATACCT | TCATATCGAG | GACTACGAAA | TTGACATTGG | TATAGTCTTT |
| 3501 | TTGCTGTTAA | GGATGTTACA | GACAAAACCTG | GAGGGGGGGT | ACAGGTTACT |
| | AACGACAATT | CCTACAATGT | CTGTTTTGAC | CTCCCCCCCCA | TGTCCAATGA |
| 3551 | GACAGCACTA | CAGGGCGCCT | ATGCATGTTA | GTAGACCATG | AATACAAGTA |
| | CTGTCTGTGAT | GTCCCGCGGA | TACGTACAAT | CATCTGGTAC | TTATGTTTCAT |
| 3601 | CCCATATGTG | TTAGGGCAAG | GTCAGGATAC | TTTAGCCCCA | GAAGTTCCCTA |
| | GGGTATACAC | AATCCCGTTC | CAGTCCTATG | AAATCGGGGT | CTGAAGGAT |

Abbildung 4.10: Parvovirus B19 LightCycler-PCR: Platzierung der Sonden Parvo 3-FL und Parvo 5-LC und Primer PVL-1 und PVL-2 im VP1-Genbereich von Parvovirus B19 (GenBank-Eintrag M13178).

4.1.3 Verwendung der Referenz-DNA zur Herstellung von Standardkurven

Zur Quantifizierung von Patientenproben mit der LightCycler-Technologie werden Standardkurven benötigt. Diese Standardkurven wurden mit Hilfe der vorher designten Referenz-DNAs hergestellt, indem Verdünnungsreihen dieser Plasmide pipettiert wurden und danach im LightCycler amplifiziert wurden. Mit Hilfe der Auswertungssoftware wurden die Standardkurven berechnet und gesichert, um sie für die jeweiligen Versuche zu verwenden. Tabelle 4.3 zeigt die Ergebnisse der Berechnung der Standardkurven und die zugeordnetet Regressionsgeraden.

Tabelle 4.3: Standardkurvenberechnung

| Standard | Regressionsgerade | r^2 | Slope | Effizienz $10^{-1/Slope}$ |
|------------------|--------------------------|-------|--------|------------------------------|
| AdV-LC-PCR | $y=-1,4954\ln(x)+45,262$ | 0,99 | -3,206 | 2,051 |
| CMV-LC-PCR | $y=-1,6382\ln(x)+42,748$ | 1,00 | -3,801 | 1,833 |
| Parvo B19-LC-PCR | $y=-1,5325\ln(x)+41,867$ | 0,99 | -3,248 | 2,032 |

Abbildung 4.11 zeigt die grafische Darstellung einer Plasmidverdünnungsreihe von pUC[HAdV2-hexon], welche logarithmische Verdünnungsstufen von 5×10^0 bis 5×10^6 Plasmidkopien pro Microliter enthielt. In Abbildung 4.12 ist die entsprechende Regressionsgerade dargestellt.

Abbildung 4.13 zeigt eine logarithmische Verdünnungsreihe des Plasmids pUC[CMV-IE724] mit $2,19 \times 10^0$ bis $2,19 \times 10^6$ Plasmidkopien pro Microliter, die als Standardkurve für die CMV-LC-PCR verwendet wurde. Abbildung 4.14 stellt die entsprechende Regressionsgerade der Standardkurve dar.

In Abbildung 4.15 sind die Kurvenverläufe einer Verdünnungsreihe von pUC[B19 VP-1] dargestellt. Es wurden Konzentrationen von 1×10^0 bis 1×10^6 Kopien pro Microliter untersucht und als Standardkurve verwendet. Die Abbildung 4.16 zeigt die passende Regressionsanalyse.

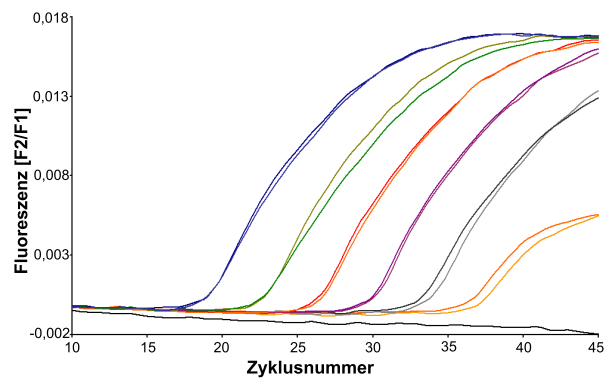


Abbildung 4.11: **Standardkurve der Adenovirus-LC-PCR.** Darstellung der Kurven einer pUC[HAdV2-hexon]-Verdünnungsreihe von 5×10^0 bis 5×10^6 Kopien/ μl im LightCycler.

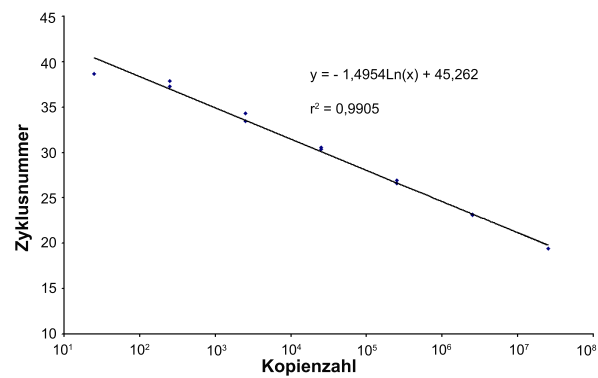


Abbildung 4.12: **Regressionsgerade.** Regressionsgerade der Standardkurve für die Adenovirus-LightCycler-PCR.

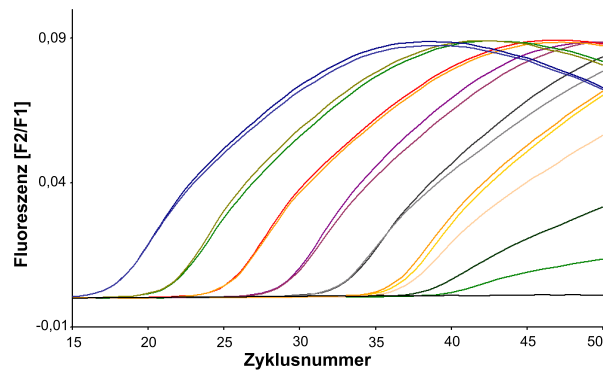


Abbildung 4.13: **Standardkurve der Cytomegalievirus-LC-PCR.** Darstellung der Kurven einer pUC[CMV-IE724]-Verdünnungsreihe von $2,19 \times 10^0$ bis $2,19 \times 10^6$ Kopien/ μl im LightCycler.

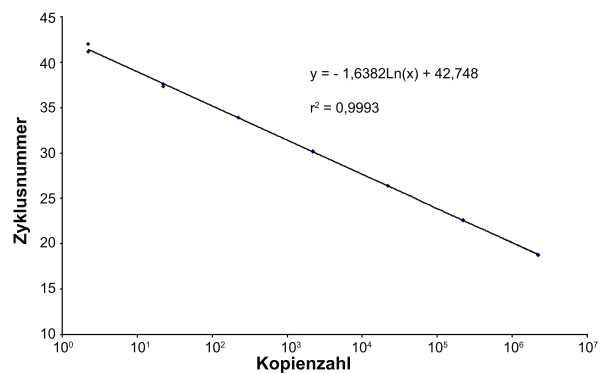


Abbildung 4.14: **Regressionsgerade.** Regressionsgerade der Standardkurve für die CMV-LightCycler-PCR.

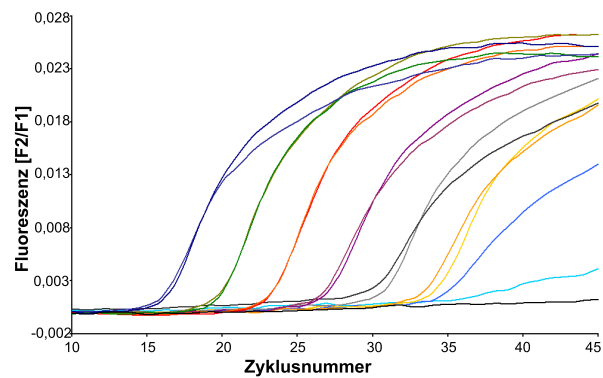


Abbildung 4.15: **Standardkurve der Parvovirus B19-LC-PCR.** Darstellung der Kurven einer Plasmid-Verdünnungsreihe von 1×10^0 bis 1×10^6 Kopien/ μl im LightCycler.

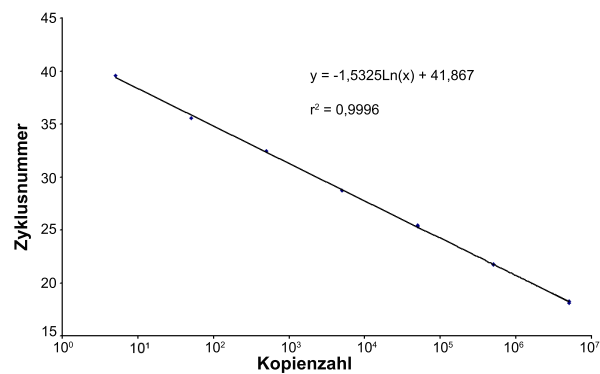


Abbildung 4.16: **Regressionsgerade.** Regressionsgerade der Standardkurve für die Parvovirus B19-LightCycler-PCR.

4.2 Anwendung der LightCycler-Technologie zum Nachweis von humanen Adenoviren

4.2.1 Reproduzierbarkeit der Adenovirus-PCR im LightCycler

In Abbildung 4.17 sind die Standardproben aufgetragen, die in jedem Lauf mit verwendet wurden. Standard I enthielt $2,5 \times 10^4$ Plasmidkopien, der Crossing Point dieser Standardprobe lag im Mittel bei Zyklus 29,84, der Variationskoeffizient dieses Standards beträgt 5 %. *Standard II* enthielt $2,5 \times 10^6$ Plasmidkopien, der Crossing Point lag im Mittel bei Zyklus 23,17, der Variationskoeffizient dieser Standardprobe beträgt 3 %.

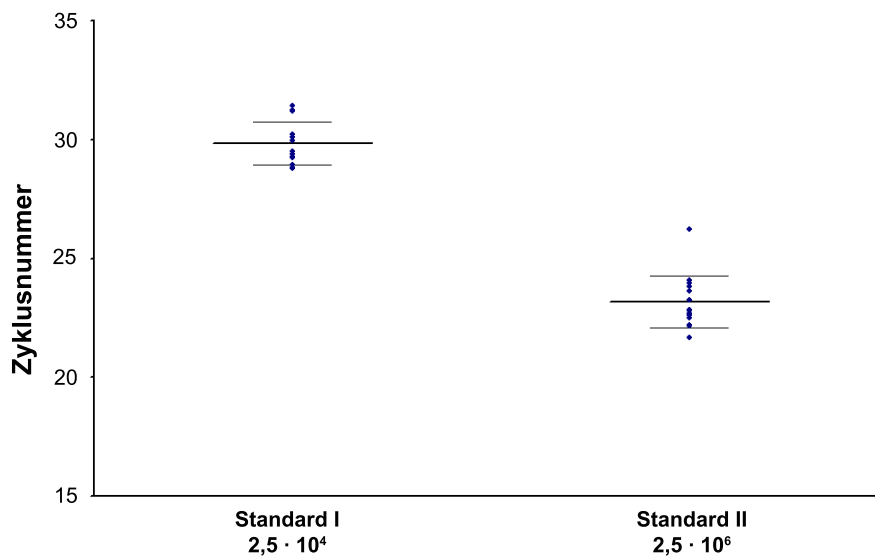


Abbildung 4.17: **Reproduzierbarkeit der Adenovirus-PCR im LightCycler.** Standard I: $2,5 \times 10^4$ pUC[HAdV2-hexon]-Kopien. Mittelwert = 29,84, Variationskoeffizient = 0,05. Standard II: $2,5 \times 10^6$ pUC[HAdV2-hexon]-Kopien. Mittelwert = 23,17, Variationskoeffizient = 0,03.

Die Ergebnisse der einzelnen Standards waren gut reproduzierbar mit Variationskoeffizienten von 0,05 bzw. 0,03.

4.2.2 Patientenproben

Insgesamt wurden 87 Patientenproben getestet, um die erstellte quantitative PCR zu evaluieren. Hierbei wurden DNA-Eluats aus zwölf verschiedenen Probenmaterialien unterschiedlicher Patienten untersucht und mit der konventionellen nested PCR verglichen (Tabelle 4.4). 66 der 87 untersuchten Proben ergaben positive Ergebnisse in der LightCycler-PCR. Diese positiven Proben hatten im Mittel eine Viruslast von $3,42 \times 10^7$ Geq/ μ l eingesetztern DNA-Eluats (2 Geq/ μ l in einer Urinprobe bis zu $1,51 \times 10^9$ Geq/ μ l in einer Stuhlprobe) (Tabelle 4.5).

Tabelle 4.4: Ergebnisse der Adenovirus PCR im LightCycler

| Material | n | LightCycler | | nested PCR | | Übereinstimmung [%] |
|------------------|-----------|-------------|-----------|------------|-----------|---------------------|
| | | pos. | neg. | pos. | neg. | |
| Aszites | 6 | 5 | 1 | 6 | 0 | 83 |
| Augenabstrich | 10 | 8 | 2 | 9 | 1 | 90 |
| Blutplasma | 7 | 7 | 0 | 7 | 0 | 100 |
| EDTA-Blut | 29 | 18 | 11 | 18 | 11 | 100 |
| Knochenmark | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 100 |
| Leberbiopsie | 2 | 2 | 0 | 1 | 1 | 50 |
| Mageninhalt | 2 | 2 | 0 | 2 | 0 | 100 |
| Rachenspülwasser | 4 | 2 | 2 | 2 | 2 | 100 |
| Stuhl | 5 | 5 | 0 | 5 | 0 | 100 |
| Trachealsekret | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 100 |
| Tubusekret | 7 | 7 | 0 | 7 | 0 | 100 |
| Urin | 12 | 8 | 4 | 12 | 0 | 67 |
| Insgesamt | 87 | 66 | 21 | 71 | 16 | 94% |

Tabelle 4.5: Genomäquivalente in den einzelnen Probenmaterialien

| Probenmaterial n | | Genomäquivalente pro μl | | |
|------------------|----|------------------------------------|--------------------|--------------------|
| | | Mittelwert | Minimum | Maximum |
| Augenabstrich | 10 | $4,27 \times 10^5$ | $1,60 \times 10^5$ | $1,28 \times 10^6$ |
| Aszites | 6 | $1,09 \times 10^3$ | $5,45 \times 10^2$ | $2,17 \times 10^3$ |
| Blutplasma | 7 | $8,57 \times 10^3$ | $7,23 \times 10^2$ | $3,97 \times 10^4$ |
| EDTA-Blut | 30 | $1,94 \times 10^4$ | $1,72 \times 10^2$ | $1,72 \times 10^5$ |
| Stuhl | 5 | $3,75 \times 10^8$ | $1,37 \times 10^7$ | $1,51 \times 10^9$ |
| Tubusabstrich | 7 | $2,15 \times 10^7$ | $6,45 \times 10^2$ | $7,13 \times 10^7$ |
| Urin | 12 | $1,43 \times 10^5$ | $2,00 \times 10^0$ | $3,97 \times 10^5$ |

4.2.3 Patientenverläufe

Im Institut für Virologie und antivirale Therapie der Universität Jena wird für die Patienten der Transplantationseinheit der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Friedrich-Schiller-Universität Jena ein virologisches Monitoring durchgeführt. Im Rahmen dieses Routinemonitorings werden wöchentlich Urin- und Blutproben, bei Bedarf auch andere Probenmaterialien, mittels nested PCR auf DNA verschiedener Viren untersucht. Infektionen mit Adenoviren verursachen in dieser Patientengruppe oftmals komplizierte Krankheitsverläufe bis hin zu schweren disseminierten Infektionen (1.1.2).

Im Jahr 2000 wurden vier Patienten erfasst, die nach einer Knochenmarktransplantation an einer schweren disseminierten Adenovirusinfektion erkrankten. Diese Infektionsverläufe wurden analysiert. Unter der Fragestellung der Viruslast-Quantifizierung wurden diese Infektionsverläufe retrospektiv mit der Adenovirus-LightCycler-PCR untersucht, um die Praktikabilität dieser Methode an konkreten Patientenverläufen zu demonstrieren. Die Krankheitsverläufe dieser vier Patienten zeigten alle das Bild einer schweren disseminierten Adenovirus-Infektion. Drei dieser Erkrankungen hatten einen letalen Ausgang.

Schmelzpunktanalyse

Um auszuschließen, dass die Adenovirusinfektionen, die in einem relativ begrenzten Zeitraum auftraten, von einer gemeinsamen Infektionsquelle ausgingen, wurde gleichzeitig zur quantitativen Untersuchung der DNA-Eluate auch eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt (Tabelle 4.6). Die Schmelzpunktanalysen ergaben für die erste Patientin einen Schmelzpunkt von $58,15^{\circ}\text{C}$ ($\pm 1,49^{\circ}\text{C}$). Die Proben der zweiten Patientin hatten einen Schmelzpunkt von $50,73^{\circ}\text{C}$ ($\pm 0,77^{\circ}\text{C}$). Die Proben des dritten Patienten hatten einen Schmelzpunkt von $58,71^{\circ}\text{C}$ ($\pm 0,99^{\circ}\text{C}$) (vergleiche Abbildung 4.18). In Korrelation zu den Daten der Sequenzierung (siehe Abbildung 4.6) kann davon ausgegangen werden, dass die einzelnen Isolate auf unterschiedliche Infektionsquellen zurückgehen.

Tabelle 4.6: Schmelzpunktanalyse der Proben der verschiedenen Patienten

| | Schmelzpunkt in $^{\circ}\text{C}$ | Standardabweichung in $^{\circ}\text{C}$ |
|----------------------|------------------------------------|--|
| Patient 1 (Göt., S.) | 58,15 | 1,49 |
| Patient 2 (Hen., S.) | 50,73 | 0,77 |
| Patient 3 (Sch., E.) | 58,71 | 0,99 |
| Standards | 63,80 | 1,32 |

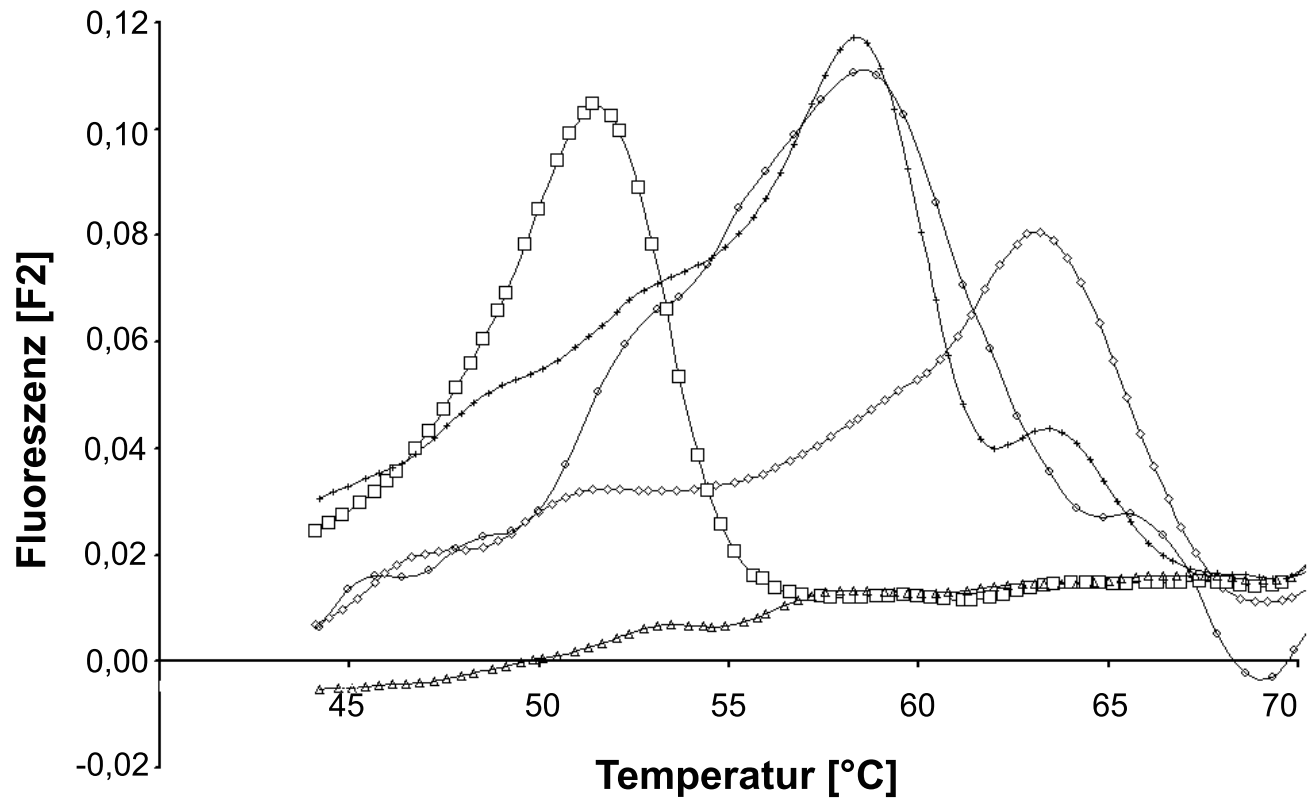


Abbildung 4.18: **Schmelzpunktanalyse.** ○ - Patient 1 (S. Göt.), □ - Patient 2 (S. Hen.), + - Patient 3 (E. Sch.), ◇ - Standard, △ - Wasserkontrolle

Patient 1

Insgesamt wurden von diesem Patienten 13 Proben untersucht. Davon wurden elf (ca. 85%) Proben positiv auf Adenovirus-DNA getestet. Im Mittel enthielten die positiven Proben $2,41 \times 10^6$ Genomäquivalente pro Microliter eingesetztem DNA-Eluat ($1,72 \times 10^2$ [EDTA] - $2,60 \times 10^7$ [Stuhl]). Ab dem 30. Tag post transplantationem konnte im EDTA-Blut Adenovirus-DNA nachgewiesen werden. Die Viruslast stieg bis zum Tag 51 stetig an, fiel bis zum Tag 55 geringfügig ab und erreichte an Tag 58 einen Maximalwert von $3,43 \times 10^7$ Geq/ml. Im Mittel enthielten die aus EDTA-Blut gewonnenen Proben $9,25 \times 10^6$ Geq/ml ($3,44 \times 10^4$ - $3,43 \times 10^7$). Insgesamt ist ein Anstieg der Viruslast um drei log-Stufen zu beobachten. An Tag 57 konnte Adenovirus-DNA auch in Urin ($2,58 \times 10^6$ Geq/ml) und Stuhl nachgewiesen werden. Einen Tag später wurde Virus-DNA auch in einem Tubusabstrich nachgewiesen. 62 Tage nach der Transplantation verstarb die Patientin. In Abbildung 4.19 ist der Infektionsverlauf dargestellt.

Patient 2

Von diesem Patienten wurden 21 Proben untersucht. In neun (42,9 %) Proben ließ sich keine Adenovirus-DNA nachweisen, zwölf (57,1 %) Proben enthielten Adenovirus-DNA. Im Mittel enthielten die Proben $1,77 \times 10^5$ Genomäquivalente pro Microliter DNA-Eluat ($2,00 \times 10^0$ [Urin] - $2,63 \times 10^6$ [Trachealsekret]). In den Urinproben ließ sich schon ab dem dritten Tag nach der Transplantation Adenovirus-DNA nachweisen. Die DNA-Menge steigt bis zum zehnten Tag stark an, fiel bis zum 14. Tag leicht ab und erreichte ihr Maximum am 24. Tag ($1,19 \times 10^7$ Geq/ml), danach fiel die Menge an Adenovirus-DNA im Urin langsam ab. Die positiven Urinproben enthielten im Mittel $4,55 \times 10^6$ Geq/ml ($4,82 \times 10^1$ - $1,19 \times 10^7$). Der Anstieg von Adenovirus-DNA im Urin erreichte fast 6 log-Stufen.

Ab dem 28. Tag wurde auch das bisher negative EDTA-Blut Adenovirus-Positiv. Die Viruslast erreicht am 31. Tag den höchsten Level ($3,08 \times 10^6$ Geq/ml) und blieb dann konstant hoch. Im Mittel enthielten die positiven Proben aus EDTA-Blut $2,19 \times 10^6$ Geq/ml. An Tag 42 nach der Transplantation wurden auch Plasma ($4,34 \times 10^5$ Geq/ml) und Trachelasekret positiv getestet. Am 44. Tag verstarb die Patientin. Abbildung 4.20 zeigt den Infektionsverlauf von Patientin 2.

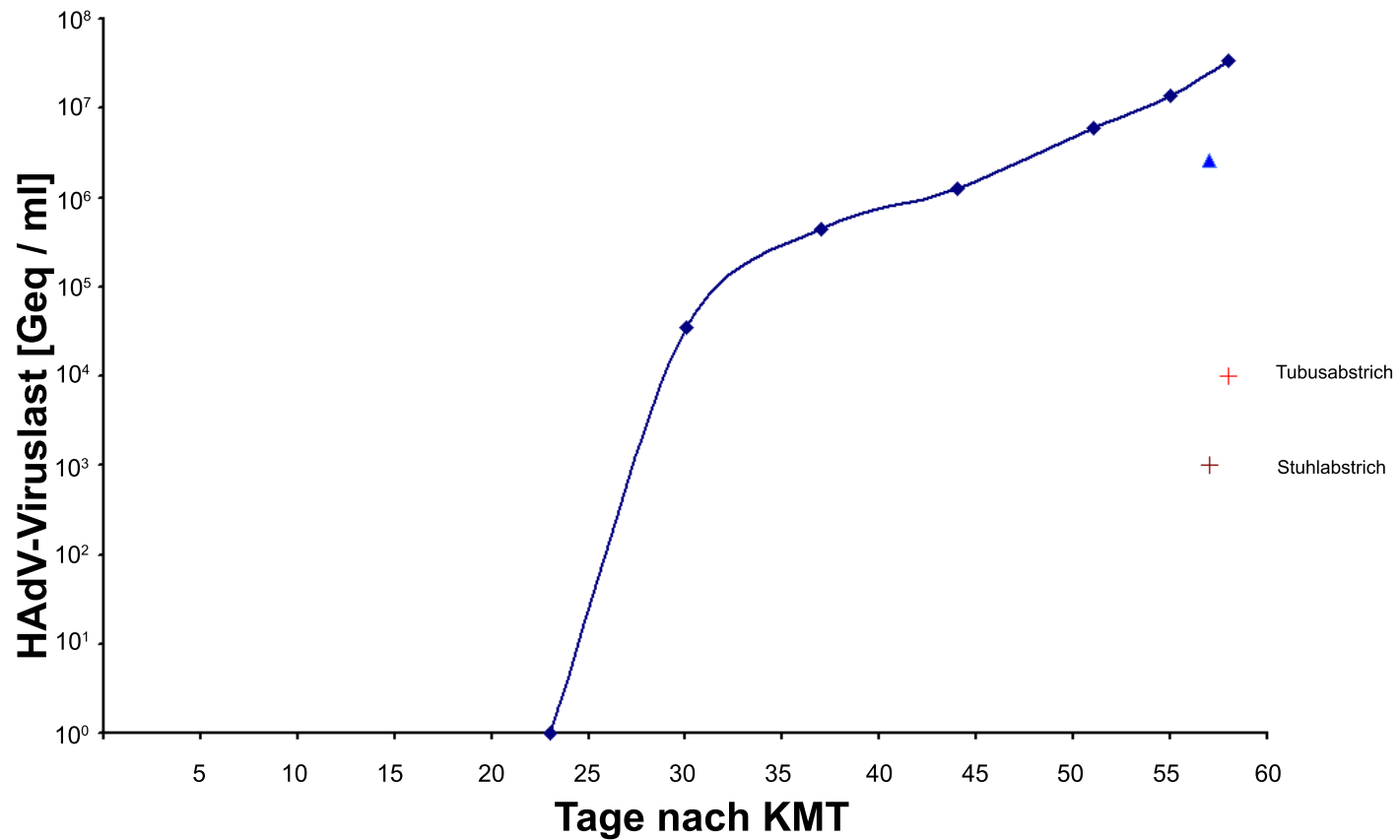


Abbildung 4.19: **Verlauf 1.** ◇: EDTA-Blut. △: Urin. Außerdem sind die positiven Stuhl- bzw. Tubusabstrichproben eingezeichnet. Ab Tag 30 nach KMT ist Adenovirus-DNA im EDTA-Blut nachweisbar, an Tag 57 werden auch Stuhl und Urinproben positiv, an Tag 58 läßt sich Adenovirus-DNA auch im Tubusabstrich nachweisen. Am 62. Tag verstirbt die Patientin.

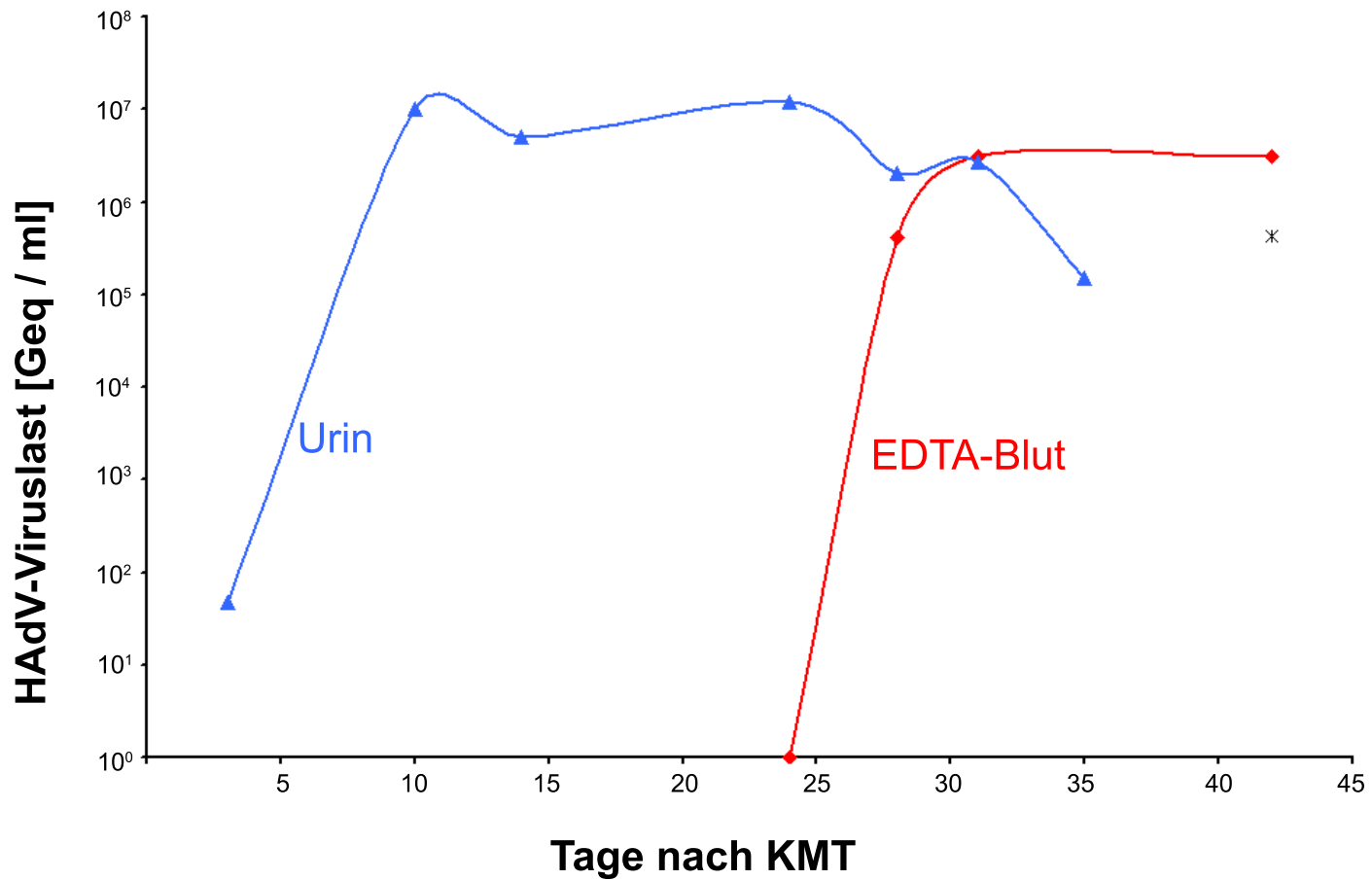


Abbildung 4.20: **Verlauf 2.** Δ : Urin. \bullet : EDTA-Blut. $*$: Plasma. Ab Tag 3 lässt sich Adenovirus-DNA im Urin nachweisen . Die Viruslast steigt bis zum Tag 10 an, fällt dann etwas nach, erreicht am Tag 24 das Maximum und fällt dann wieder ab. Ab Tag 28 wird Adenovirus-DNA im EDTA-Blut nachgewiesen, am Tag 42 folgen Plasma und Trachealsekret. An Tag 44 verstirbt die Patientin.

Patient 3

Vom dritten Patienten wurden insgesamt 46 Proben untersucht, davon waren 42 (91%) Proben Adenovirus-Positiv. Im Mittel enthielten die positiven Proben $6,17 \times 10^7$ Genomäquivalente pro Microliter eingesetztem DNA-Eluats ($5,45 \times 10^2$ [Aszites] - $1,51 \times 10^9$ [Stuhl]). Am 14. Tag nach der Transplantation konnte in Proben aus Urin, Plasma, Rachenspülwasser und Stuhl Adenovirus-DNA nachgewiesen werden. Die Viruslast im Plasma stieg auf einen Maximalwert von $4,76 \times 10^6$ Geq/ml an. Fiel dann wieder langsam ab, um ab dem 28. Tag wieder anzusteigen. Im Mittel betrug die im Plasma gemessene Viruslast $1,19 \times 10^6$ Geq/ml ($8,84 \times 10^4$ - $4,76 \times 10^6$). Bis zum 16. Tag waren die Proben aus EDTA-Blut negativ. Der erste positive Befund war in einer Probe vom 17. Tag zu messen. Die Viruslast stieg schnell an. Der Peakwert wurde am 45. Tag mit $1,67 \times 10^6$ Geq/ml erreicht. Im Mittel enthielten die Proben aus EDTA-Blut eine Viruslast von $8,57 \times 10^5$ Geq/ml ($4,27 \times 10^5$ - $1,67 \times 10^6$). An Tag 24 konnte Adenovirus-DNA im Aszitespunktat und im Mageninhalt nachgewiesen werden, zusätzlich war am 24. Tag der erste Tubusabstrich Adenovirus-Positiv. Die Virusmenge im Tubusabstrich stieg stetig an von initial $3,22 \times 10^3$ Geq/ μ l DNA-Eluat am 24. Tag auf $3,57 \times 10^8$ Geq/ μ l an Tag 49. Das ist ein Anstieg um fünf log-Stufen. Im Verlauf wurde am 32. Tag eine Leberbiopsie entnommen, in der auch Adenovirus-DNA nachgewiesen werden konnte. Eine Aufarbeitung der Leber post mortem erbrachte eine ähnlich hohe Viruslast in der Leber. Schließlich wurde in einer am 37. Tag entnommenen Knochenmarkprobe ebenfalls Adenovirus-DNA nachgewiesen. Der Patient verstarb am 49. Tag nach der Transplantation. Abbildung 4.21 stellt den Infektionsverlauf grafisch dar.

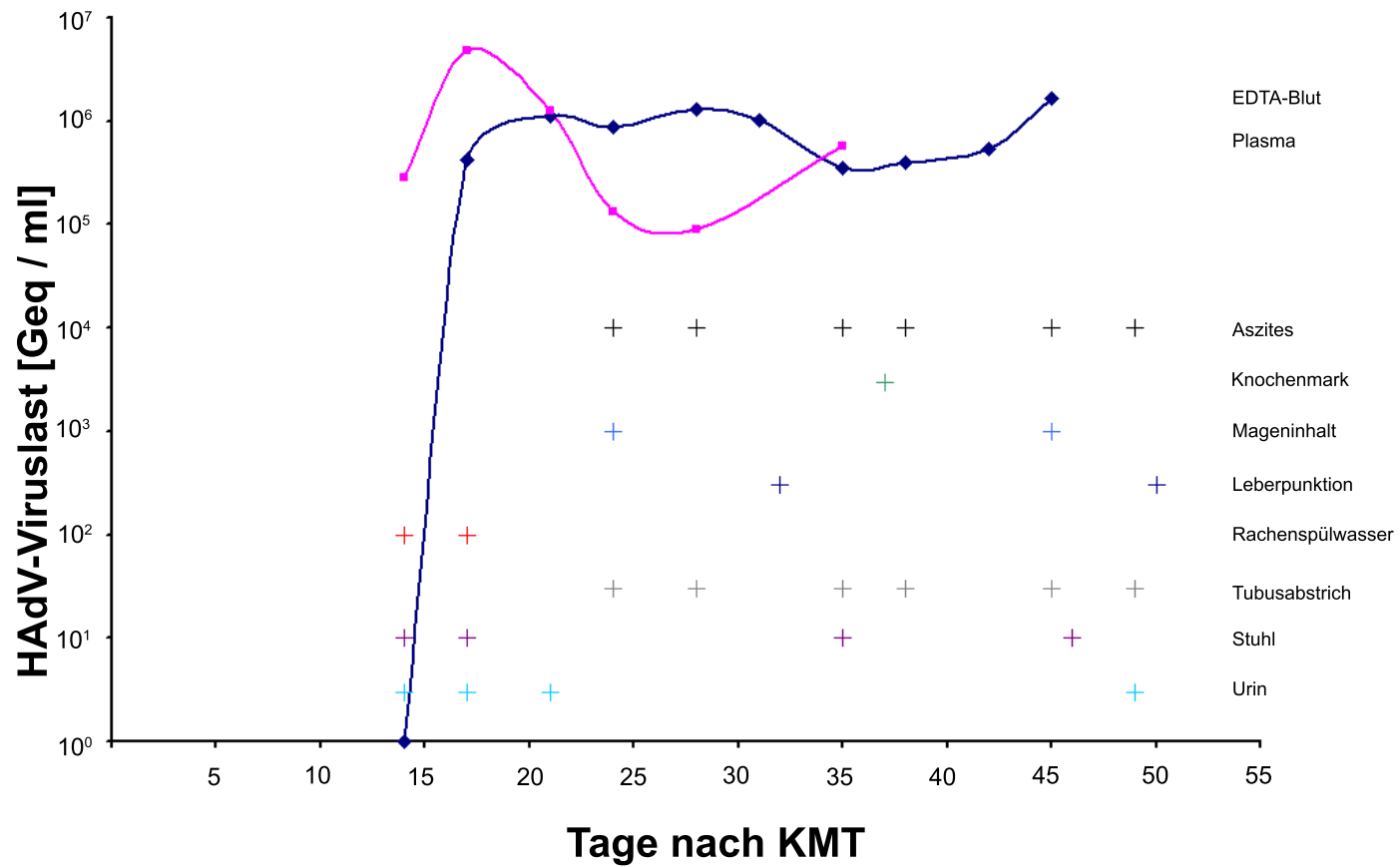


Abbildung 4.21: **Verlauf 3**. \diamond : EDTA-Blut. \square : Plasma. Ab Tag 14 sind die ersten Proben AdV-positiv. Die Viruslast im Plasma steigt auf einen maximalen Peak, sinkt, um danach stetig zu steigen. Die Viruslast im EDTA-Blut steigt schnell an. Der Patient verstirbt am 49. Tag. Zu diesem Zeitpunkt wurde aus elf verschiedenen Materialien AdV nachgewiesen.

4.3 Anwendung der LightCycler-Technologie zum Nachweis von Cytomegalievirusinfektionen

4.3.1 Reproduzierbarkeit der CMV-LightCycler-PCR

Die Analyse aller in den Versuchen mitgeführten Standardproben ergab einen Mittelwert von 35,38 für die Standardprobe I mit $2,19 \times 10^2$ Plasmidkopien pro Mikroliter, der Variationskoeffizient für diese Probe betrug 3,33%. Der CrossingPoint für die Standardprobe II, die $2,19 \times 10^4$ Plasmidkopien pro Microliter enthielt, lag im Mittel bei Zyklus 27,15 mit einem Variationskoeffizienten von 3,59 %. Die einzelnen Standardproben waren in mehreren Untersuchungen gut reproduzierbar.

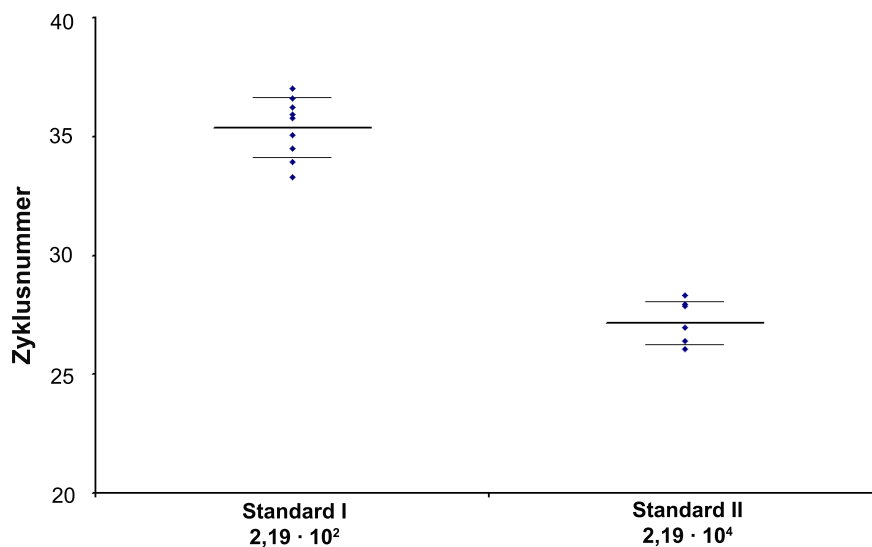


Abbildung 4.22: **Reproduzierbarkeit der CMV-PCR im LightCycler.** Standard I: $2,19 \times 10^2$ Plasmidkopien. Mittelwert = 35,38, Variationskoeffizient = 0,03. Standard II: $2,19 \times 10^4$ Plasmidkopien. Mittelwert = 27,15, Variationskoeffizient = 0,04.

4.3.2 Ringversuche

Zur Evaluierung des Diagnostik-Ansatzes zum Nachweis von CMV erfolgte die Teilnahme an drei aufeinanderfolgenden Instand-Ringversuchen. In Tabelle 4.7 sind die Ergebnisse der verschiedenen Ringversuchsproben aufgeführt. Alle untersuchten Proben des Instand-Ringversuches wurden korrekt eingeschätzt.

Tabelle 4.7: Ergebnisse der Ringversuchevaluierung für CMV

| Ringversuch Proben-Nr. | Eigene CMV-LC-PCR [Kopien/ml] | Offizielles Ergebnis [Kopien/ml] | Bewertung |
|---------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|-----------|
| 15029 | 480027 | 55550-5555000 | korrekt |
| 15030 | 4654900 | 265000-26500000 | korrekt |
| 15031 | 0 | 0 | korrekt |
| 15032 | 39230 | 9180-918000 | korrekt |
| 15033 | 3254287 | 100000-10000000 | korrekt |
| 15034 | 0 | 0 | korrekt |
| 15035 | 35873 | 6100-610000 | korrekt |
| 15036 | 567760 | 31000-3100000 | korrekt |
| 15037 | 0 | 0 | korrekt |
| 15038 | 652687 | 28590-2859000 | korrekt |
| 15039 | 10111547 | 107500-10750000 | korrekt |
| 15040 | 61693 | 5935-593450 | korrekt |

4.3.3 Patientenproben

Insgesamt wurden 32 verschiedene Proben untersucht. 15 EDTA-Blut-Proben und 17 Plasma-Proben. 26 Proben wurden positiv auf CMV getestet, sechs Proben waren CMV-negativ. Im Mittel enthielten die EDTA-Blut-Proben $1,15 \times 10^3$ Genomäquivalente pro Microliter eingesetztem DNA-Eluat ($1,0 \times 10^0$ (EDTA-Blut) - $1,01 \times 10^5$ (Plasma) Geq/ μ l). Die Ergebnisse der untersuchten Proben stimmten mit den Ergebnissen der konventionellen nested PCR überein.

4.3.4 Patientenverlauf

Im Rahmen der Evaluierung der LC-PCR-Methode wurde ein Infektionsverlauf eines Patienten nach KMT retrospektiv betrachtet. Insgesamt wurden von diesem Patienten 14 verschiedene Proben untersucht, neun EDTA-Blut-Proben und fünf Blutplasma-Proben.

Tabelle 4.8: Ergebnisse der Auswertung der Patientenproben für CMV

| Material | n | pos. | neg. | Mittelwert [Geq / μ l] | Min [Geq / μ l] | Max [Geq / μ l] |
|-----------|-----------|-----------|----------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| EDTA-Blut | 15 | 12 | 3 | $1,15 \times 10^3$ | $1,00 \times 10^0$ | $1,44 \times 10^4$ |
| Plasma | 17 | 14 | 3 | $2,21 \times 10^4$ | $1,40 \times 10^0$ | $1,01 \times 10^5$ |
| Σ | 32 | 26 | 6 | $6,20 \times 10^4$ | $1,00 \times 10^0$ | $1,01 \times 10^5$ |

Übereinstimmend mit der konventionellen nested PCR ergaben elf (79%) Proben positive Ergebnisse (sechs EDTA-Blut-Proben und fünf Blutplasma-Proben), vier (11%) untersuchte Proben wurden negativ getestet (ausnahmslos EDTA-Blut-Proben). Im Mittel enthielten die positiven Proben $8,0 \times 10^0$ Genomäquivalente pro Microliter eingesetztem DNA-Eluat ($1,0 \times 10^0$ [EDTA-Blut]

- $2,2 \times 10^1$ [EDTA-Blut]). Am 38. Tag wurde zum ersten Mal CMV-DNA in einer Probe aus EDTA-Blut nachgewiesen. Die Viruslast erreichte einen Peakwert von $4,36 \times 10^3$ Geq/ml, fiel bis zum 52. Tag ab, erreichte am 55. Tag einen zweiten Gipfel mit $2,3 \times 10^3$ Geq/ml und fiel danach sehr schnell ab. Im Mittel hatten die positiven Proben aus EDTA-Blut eine Viruslast von $2,22 \times 10^3$ Geq/ml (2×10^2 - $4,36 \times 10^3$). Ab dem 45. Tag wurden auch CMV-Positive Ergebnisse bei Plasmaproben beobachtet. Die maximale Viruslast im Plasma betrug am 59. Tag $8,4 \times 10^2$ Geq/ml. Im Mittel enthielten die positiven Plasmaproben $5,23 \times 10^2$ Geq/ml ($1,68 \times 10^2$ - $8,4 \times 10^2$). An diesem Tag ergab der pp65-Antigenämie-Nachweis 27 und 18 positive Zellen. Abbildung 4.3.4 stellt den Infektionsverlauf grafisch dar.

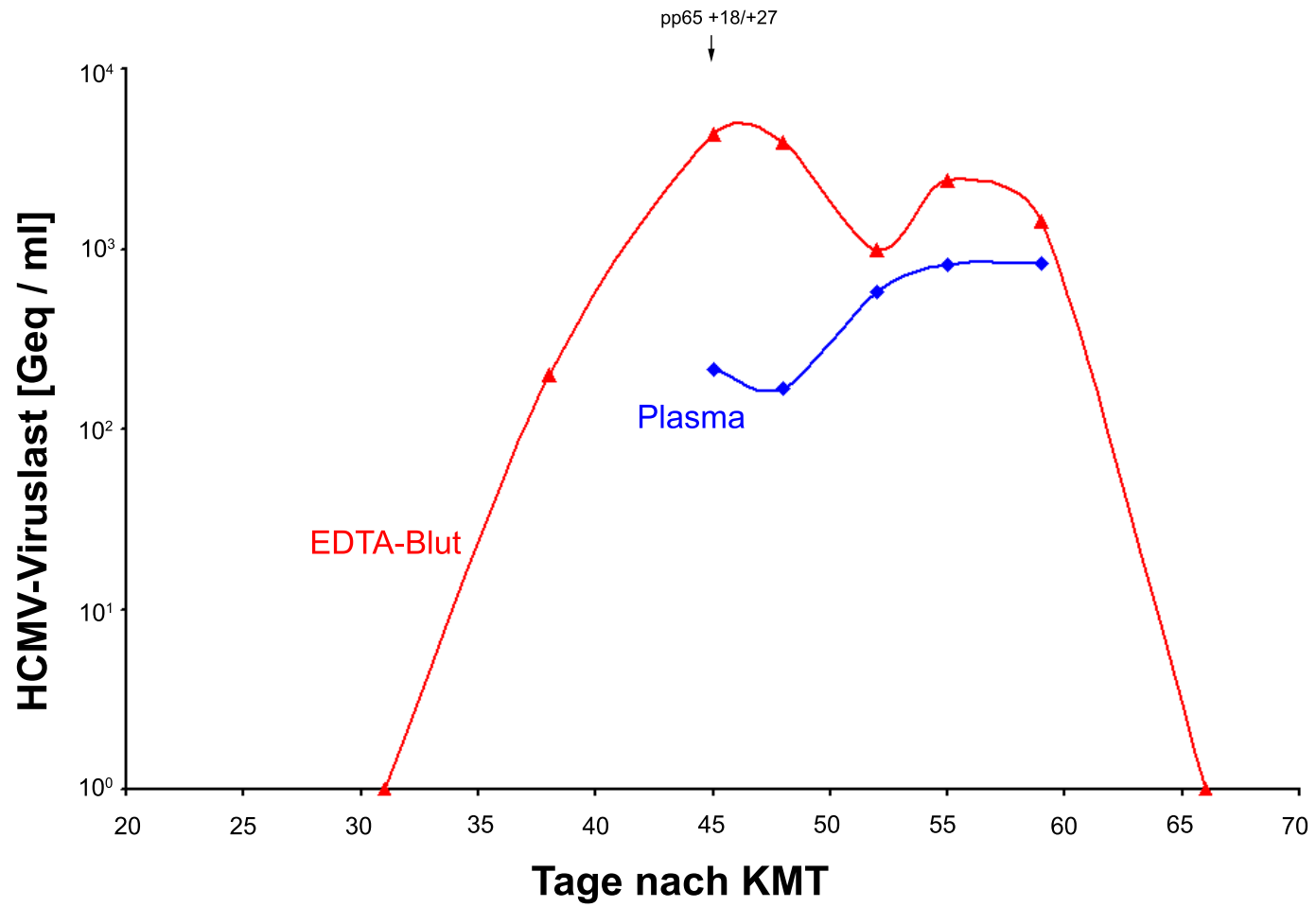


Abbildung 4.23: Verlauf. Δ : EDTA-Blut. \diamond : Plasma. Die erste CMV-positive Probe war am 38. Tag eine Probe aus EDTA-Blut. Ab Tag 45 wurden auch Plasmaproben CMV-positiv.

4.4 Anwendung der LightCycler-Technologie zum Nachweis von Parvovirus B19

4.4.1 Reproduzierbarkeit der Parvovirus B19-LightCycler-PCR

In Abbildung 4.24 sind die Standardproben aufgetragen, die in jedem Lauf mitverwendet wurden. Standard I enthielt 5×10^3 Plasmidkopien, der Crossing Point dieser Standardprobe lag im Mittel bei Zyklus 30,06, der Variationskoeffizient dieses Standards betrug 4 %. Standard II enthielt 5×10^5 Plasmidkopien, der Crossing Point lag im Mittel bei Zyklus 22,71, der Variationskoeffizient dieser Standardprobe betrug 5 %. Auch die Untersuchung der Plasmid-Standard-Proben für die Parvovirus B19-LC-PCR ergaben eine gute Reproduzierbarkeit.

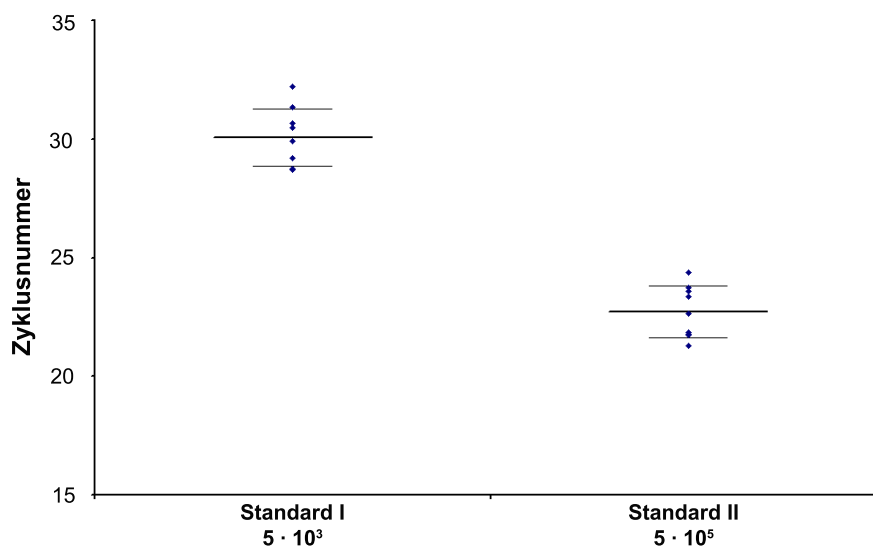


Abbildung 4.24: **Reproduzierbarkeit der Parvovirus B19-PCR im LightCycler.** Standard I: 5×10^3 Plasmidkopien. Mittelwert = 30,06, Variationskoeffizient = 0,04. Standard II: 5×10^5 Plasmidkopien. Mittelwert = 22,71, Variationskoeffizient = 0,05.

4.4.2 Ringversuche

Um die Qualität der Parvovirus B19 LightCycler-PCR zu evaluieren, erfolgte die Teilnahme an Instand-Ringversuchen. Tabelle 4.9 listet die Ergebnisse der einzelnen Ringversuche auf. Die bereitgestellten Ringversuchsproben wurden auch im Fall der Parvovirus

B19-LC-PCR korrekt erfasst.

4.4.3 Patientenproben

Insgesamt wurden 42 Proben auf Parvovirus B19-DNA untersucht. 26 Proben zeigten ein positives Ergebnis, 16 Proben waren negativ. Als Probenmaterialien wurden EDTA-Blut, Blutplasma und Myokardbiopsien verwendet. In den zwölf Parvovirus B19-positiven Myokardbiopsien fanden sich im Mittel $1,33 \times 10^1$ Genomäquivalente pro Microliter eingesetztem DNA-Eluat ($1,00 \times 10^0$ bis $3,04 \times 10^1$ Geq/ μ l). Im Mittel fanden sich $4,98 \times 10^2$ Genomäquivalente pro Microliter eingesetztem DNA-Eluat in den fünf Parvovirus B19 positiven EDTA-Blut-Proben ($5,48 \times 10^1$ - $1,76 \times 10^3$ Geq/ μ l). Insgesamt waren neun von zwölf verschiedenen Plasmaproben Parvovirus B19-positiv. Im Mittel enthielten die positiven Proben $5,06 \times 10^2$ Genomäquivalenten pro Microliter eingesetztem DNA-Eluat ($1,66 \times 10^1$ - $2,06 \times 10^4$ Geq/ μ l). Die Ergebnisse der Parvovirus B19-LC-PCR zeigten eine 100%ige Übereinstimmung mit der konventionellen Parvovirus B19-nested-PCR.

Tabelle 4.9: Ergebnisse der Ringversuche für Parvovirus B19

| Ringversuch Proben-Nr. | Eigene B19-LC-PCR [Kopien/ml] | Parvo | Offizielles Ergeb- nis [Kopien/ml] | Bewertung |
|-----------------------------------|--|--------------|---|------------------|
| 17001 | 6140 | | 160-16000 | korrekt |
| 17002 | 411020 | | 29470-2947000 | korrekt |
| 17003 | 0 | | 0 | korrekt |
| 17004 | 16360 | | 3235-323500 | korrekt |
| 17005 | 17910 | | 1170-117000 | korrekt |
| 17006 | 0 | | 0 | korrekt |
| 17007 | 278820 | | 16000-1600000 | korrekt |
| 17008 | 2990 | | 130-13000 | korrekt |
| 17009 | 269620 | | 22190-2219000 | korrekt |
| 17010 | 45400 | | 1615-161500 | korrekt |
| 17011 | 1660 | | 185-18450 | korrekt |
| 17012 | 0 | | 0 | korrekt |

Tabelle 4.10: Ergebnisse der Auswertung der Patientenproben für Parvovirus B19

| Material | n | pos. | neg. | Mittelwert [Geq / μ l] | Min [Geq / μ l] | Max [Geq / μ l] |
|----------------|-----------|-----------|-----------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| EDTA-Blut | 6 | 5 | 1 | $4,98 \times 10^2$ | $5,48 \times 10^1$ | $1,76 \times 10^3$ |
| Myokardbiopsie | 24 | 12 | 12 | $1,33 \times 10^1$ | $1,00 \times 10^0$ | $3,04 \times 10^1$ |
| Plasma | 12 | 9 | 3 | $5,06 \times 10^2$ | $1,66 \times 10^1$ | $2,06 \times 10^4$ |
| Σ | 42 | 26 | 16 | $2,53 \times 10^3$ | $1,00 \times 10^0$ | $2,06 \times 10^4$ |

5 Diskussion

Im nachfolgenden Kapitel soll entsprechend der Zielsetzung diskutiert werden, ob die gezeigte Methodenentwicklung zum Einsatz in der virologischen Diagnostik geeignet ist. Ein besonderes Augenmerk soll hierbei auf die Anwendbarkeit und die Einsatzmöglichkeiten gelegt werden. Desweiteren soll diskutiert werden, in welchen Bereichen die Routine-Diagnostik ergänzt bzw. ersetzt werden kann.

5.1 Fragestellung und Ziel

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein diagnostisches Werkzeug zum Nachweis und zur Quantifizierung von viraler DNA bei Patienten nach Stammzell- bzw. KMT zu gewinnen. Hierbei wurden Viren einbezogen, die in dieser Patientengruppe für schwerwiegende Komplikationen verantwortlich sind. Dies gilt in besonderem Maße für die humanen AdV und das humane CMV. Mittlerweile gibt es mehrere Systeme zur Durchführung quantitativer DNA-Analysen. Dem Institut für Virologie und Antivirale Therapie der Friedrich-Schiller-Universität Jena stand ein LightCycler-Gerät der Firma Roche Diagnostics GmbH zur Verfügung. Basierend auf den bereits in der Routine-Diagnostik eingesetzten PCR-Protokollen für den Nachweis von humanen AdV, humanen CMV und Parvovirus B19 wurden Protokolle zur DNA-Quantifizierung im LightCycler erarbeitet. Hierbei war es zur Minimierung der Kontaminationsgefahr entscheidend, einen Nachweis mit einem einzigen Reaktionsablauf zu etablieren.

Zur Evaluierung und Erprobung der vorgestellten Methoden wurden Untersuchungen an verschiedenen Patientenmaterialien durchgeführt und mit den Ergebnissen der konventionellen PCR-Untersuchungen verglichen. Außerdem wurden definierte Proben aus den Instand-Ringversuchen analysiert und mit den Ergebnissen verglichen.

5.2 Methodenetablierung

5.2.1 Auswahl des fluoreszenzemittierenden Systems

Für den LightCycler sind zwei verschiedene fluoreszenzemittierende Systeme vorgesehen. Wie bereits in Kapitel 1.2.1 dargestellt, wird entweder ein mit doppelsträngiger DNA interkalierender Farbstoff verwendet (*SYBR-Green Format*) oder die Lichtemission entsteht durch die Interaktion zweier spezifischer, mit Farbstoff markierten Hybridisierungs-sonden (*Hybridization probes*).

Um die Primer zu testen wurde in Vorversuchen das SYBR-Green®-Format verwendet. Für die endgültigen Testsysteme sollten aber Hybridisierungs-sonden verwendet werden.

Die Verwendung von Hybridisierungs-sonden führt zu einem geringeren *Background*-Rauschen, so dass eine höhere Sensitivität erwartet werden konnte. Durch die Hybridisierung der beiden DNA-Sonden an der Ziel-DNA wird nur DNA durch die Messung erfasst, an die beide Sonden in einem Anstand von nicht mehr als 4 Basen binden. Eine Messung von Primerdimeren oder unspezifischen Produkten ist dadurch sehr unwahrscheinlich, da lediglich die Bindung beider Sonden an die amplifizierte DNA ein Fluoreszenzsignal verursachte. In der vorliegenden Arbeit wurden für das LightCycler-PCR-Format fluoreszenzmarkierte Hybridisierungs-sonden verwendet.

5.2.2 Reaktionsansatz

Zu Beginn der Untersuchungen wurde der von Roche Diagnostics GmbH vertriebene *LightCycler-FastStart-DNA-Master Hybridization Kit* verwendet. Dieses Testsystem diente zur Optimierung der Versuchsbedingungen.

Aus Kostengründen ergab sich die Notwendigkeit, einen Reaktionsansatz aus Einzelkomponenten zusammenzustellen. Nur die kommerziell erhältliche Platinum Taq DNA Polymerase von Invitrogen (ehemals Gibco BRL) erfüllte die speziellen Anforderungen für die Real-Time-PCR im LightCycler (Kreuzer et al. 2000 [52]). In umfangreichen Versuchen wurden die Einzelkomponenten des alternativen Reaktionsansatzes aufeinander abgestimmt. Eine Optimierung der MgCl₂-Konzentration, der Konzentration der Polymerase und der Zusätze war notwendig. Als DNA-Stabilisator wurde bovines Serumalbumin (BSA) verwendet.

Die Verwendung des eigenen Reaktionsgemisches brachte sofort deutlich bessere Ergebnisse. Die Grenze der nachweisbaren Plasmid-DNA lag mit ca. 50 Plasmidkopien pro Reaktionsansatz um den Faktor 100 niedriger als bei den vorangegangenen Versuchen

mit dem kommerziellen Kitsystem. Durch experimentelle Variation der einzelnen Bestandteile des Reaktionsgemisches konnte eine Nachweisgrenze von fünf Plasmidkopien pro Reaktionsansatz erreicht werden, also um den Faktor 1000 niedriger als mit dem kommerziellen Kitsystem. Durch die Verwendung des alternativen Reaktionsansatzes wurde ein ausreichend sensitiver Nachweis viraler DNA aus Patientenproben ermöglicht. Ein weiteres Argument für die zusammengestellten Einzelkomponenten ist der deutlich günstigere Preis, der sich vor allem in der Entwicklungsphase als vorteilhaft herausstellte.

5.2.3 Kopienstandards

Eine genaue Quantifizierung der Viruslast ist an den Einsatz von Referenz-DNA gekoppelt. An diese sind hohe Anforderungen zu stellen, da von ihr in hohem Maße die Qualität des Testsystems abhängt. Es ist notwendig, dass die Zahl der Genomäquivalente, welche die Referenz-DNA enthält, genau definiert ist. Um diesen Anforderungen gerecht zu werden, wird in den meisten Fällen Referenz-DNA in Form von Plasmiden verwendet (Nitsche et al. 2000 [68], Najioullah et al. 2001 [66], Espy et al. 2000 [29]).

Die Nutzung von Plasmiden hat den Vorteil, dass jede gewünschte Gensequenz in ein Plasmid kloniert werden und danach die genaue Anzahl der Plasmide, anhand von DNA-Konzentration und Plasmidlänge, berechnet werden kann. Im günstigsten Fall ist das gesamte Virus-Genom im Plasmid enthalten, um eine Vergleichbarkeit mit anderen Nachweissystemen zu gewährleisten. Dies ist jedoch selten möglich, da die Virusgenome zu groß sind um sie in ein Plasmid einzubringen. Deshalb verwenden die meisten Testsysteme Plasmide als Referenz-DNA, die genau die Gensequenz enthalten, die auch amplifiziert wird.

Zur Optimierung des Versuchsansatzes wurden Standardkurven aus Verdünnungsreihen der hergestellten Plasmide berechnet. Um diese zur Quantifizierung verwenden zu können, wurden jedem LightCycler-Lauf zwei Standardproben beigefügt. Im Vergleich mit einer Verdünnungsreihe ohne Zusätze zeigte sich, dass die Stabilisierung der Plasmid-Verdünnungsreihen mit λ -DNA eine deutliche Verbesserung der Haltbarkeit zur Folge hatte. Die so stabilisierten Plasmidproben zeigten im Gegensatz zu den unbehandelten Plasmidproben auch nach 72 stündiger Aufbewahrung im Kühlschrank keinen Abfall der DNA-Konzentration.

5.2.4 Arbeitsablauf

In der klinischen Praxis werden Therapieoptionen oft von Laborwerten bzw. von Ergebnissen mikrobiologischer bzw. virologischer Diagnostik abhängig gemacht. Aus diesem Grund werden Systeme benötigt, die schnell zuverlässige Ergebnisse liefern. Der Hauptvorteil des *LightCycler*-Systems liegt in seiner Schnelligkeit.

Die *LightCycler*-PCR und die konventionelle PCR-Reaktion verwenden DNA-Isolate aus Patientenproben. Dem entsprechend ist die Aufarbeitungszeit, das heißt die Zeit von der Probenanlieferung bis zur isolierten DNA, identisch. Will man eine Probe, die in der konventionellen PCR qualitativ positiv getestet wurde, zusätzlich quantifizieren, ist keine erneute Aufarbeitung der Patientenprobe nötig.

Auch in der Vorbereitungszeit der Reaktionsgemische unterscheidet sich die *LightCycler*-PCR kaum vom konventionellen PCR-Verfahren. Die Reaktionsgemische werden in einem Reinraum hergestellt. Unter einer separaten Sterilwerkbank werden die DNA-Isolate hinzugefügt. Im Falle der konventionellen PCR folgt nun die Amplifikation im Thermocycler, während die DNA-enhaltenden Reaktionsansätze im Falle des *LightCyclers* in die speziellen Glaskapillaren hineinzentrifugiert werden müssen.

Ein großer Vorteil ist die Schnelligkeit der Amplifikation im *LightCycler*. Die Thermoeinheit des *LightCycler* arbeitet mit der Erwärmung und Abkühlung von Luft. Dieses Verfahren, kombiniert mit der großen Oberfläche der Glaskapillaren, ermöglicht sehr viel schnelleres Arbeiten, als es die massiven Thermoblöcke der konventionellen Thermocyclers erlauben. Mit dem *LightCycler* sind Temperaturveränderungen von bis zu 20 °C pro Sekunde möglich. Das bedeutet, die Temperaturen der einzelnen PCR-Phasen sind sehr viel schneller zu erreichen als im Thermocycler. Dieser Vorteil summiert sich, so dass der *LightCycler* ca. 45 Minuten bis maximal eine Stunde für 50 Amplifikationszyklen benötigt, während die Amplifikation im Thermocycler mit den gleichen Bedingungen ca. drei Stunden dauert. Oftmals wird bei der konventionellen PCR-Methode zum qualitativen Virusnachweis noch eine zweite sog. *nested* PCR benötigt, um eine ausreichende Empfindlichkeit zu erhalten. Diese zweite PCR-Reaktion nimmt zusätzlich Zeit in Anspruch und stellt ein Kontaminationsrisiko dar.

Am Ende der konventionellen PCR-Reaktion ist eine Gel-Analyse der Amplifikate erforderlich. Dies geschieht mittels einer Gelelektrophorese im Anschluß an die Amplifikation. Die Gelelektrophorese benötigt wiederum Zeit (ca. eine Stunde). Während der Amplifikation im *LightCycler* kann man in Echtzeit die Veränderungen der Fluoreszenzsignale der einzelnen Proben am Bildschirm verfolgen und hat sofort eine qualitative Aussage, sobald die Fluoreszenz einer Probe ansteigt. Durch die Mitnahme von Kopi-

enstandards kann man zumeist schon während der Amplifikationsphase eine semiquantitative Aussage treffen. Die anschließende Analyse der Fluoreszenzdaten erlaubt eine genaue Quantifizierung.

Bei einer konventionellen nested PCR, bei der das Ausgangsmaterial zunächst amplifiziert wird und daran anschließend eine zweite Amplifikation durchgeführt wird, besteht ein hohes Kontaminationsrisiko. Um dieses zu vermeiden sind One-Step-Verfahren zu bevorzugen, da hier ein Öffnen der Proben während des Nachweisverfahrens wegfällt. Ein Spezifitätsnachweis wird im LightCycler mit Hybridisierungssonden erreicht, während bei der konventionellen PCR ein Spezifitätsnachweis nur an Hand einer Größenbeurteilung des Amplifikates im Agarosegel möglich ist. Alternativ kann auch eine nested PCR oder eine Hybridisierungsreaktion als Spezifitätsnachweis dienen. Ein Nachteil der LC-PCR ist der größerer finanzielle Aufwand. Berücksichtigt man alle Vor- und Nachteile von konventioneller PCR und LC-PCR, so haben beide Methoden in der virologischen Routinediagnostik ihre Berechtigung.

5.3 Methodenevaluation

5.3.1 Humanes Adenovirus

Humane AdV können bei immunsuprimierten Patienten schwerste Komplikationen verursachen, die jedes Organsystem betreffen können. Speziell Patienten mit Risikofaktoren, hinsichtlich einer Infektion mit Adenoviren, sollten einer regelmäßigen Kontrolle zugeführt werden. Als Risikofaktoren werden niedriges Alter, T-Zell-depletierte Transplantate, eine Transplantat-Wirt-Reaktion (GvH), Transplantate von nicht HLA-identischen Spendern oder nicht HLA-identischem Nabelschnurblut diskutiert (Flomenberg et al. 1994 [31], La Rosa et al. 2001[79], Hale et al. 1999 [37]).

Die Quantifizierung der DNA von humanen Adenoviren erfolgte in Anlehnung an die konventionelle PCR über eine Amplifikation des Hexon-Gens. Aufgrund der großen Intraspeziesvariation der AdV musste eine hoch-konservierte Genregion ausgewählt werden. Das Anliegen der vorliegenden Arbeit war, möglichst alle der 51 bekannten Serotypen der humanen Adenoviren mit einem Verfahren nachzuweisen, wobei als Minimal Kriterium der Nachweis der besonders für Patienten nach Transplantation relevanten Serotypen 1, 2, 5, 34 und 35 erreicht werden sollte (Dini et al 2004 [23], Ljungman 2004 [58]).

Leruez-Ville et al. entschieden sich ebenfalls für die Amplifizierung einer Zielsequenz aus dem Hexongen, benutzten aber drei verschiedene Primerpaare, um jeden einzelnen Subtyp von Adenovirus zu erfassen (Leruez-Ville et al. 2004 [55]). Lion et al. erarbeiteten einen Ansatz mit sechs verschiedenen Primerpaaren, die eine Zielsequenz im Bereich des Hexongens für die Subgenera A, B, C, E und F amplifizieren und für den Subgenus D eine Zielsequenz im VA RNA-Gen (Lion et al. 2003 [57]). Heim et al. benutzen hingegen ein einzelnes Primerpaar aus dem Hexongenbereich (Heim et al. 2003 [41]).

Leruez-Ville et al. und Lion et al. stellten in Frage, ob ein Nachweis aller Serotypen mit einem einzigen Primerpaar erfolgen kann. Für die LightCycler-PCR zum Nachweis der AdV-DNA wurde in dieser Arbeit nur ein Primerpaar verwendet, welches im Rahmen der konventionellen nested PCR sämtliche relevanten Serotypen erfassen konnte. Die Hybridisierungs sonden wurden in eine ebenfalls möglichst homologe Sequenz zwischen den beiden Primerpaaren gelegt. Für das Primer- und Sondendesign wurde, unter Einbeziehung aller in GeneBank vorhandener Sequenzen der verschiedenen AdV-Serotypen, eine möglichst homologe Sequenz aus dem hochkonservierten Hexongen ausgewählt.

Die Sensitivität dieser Methode wurde ermittelt, indem eine Verdünnungsreihe der Plasmid-DNA im LightCycler getestet wurde. Die Standard-Plasmidreihe deckte einen

Bereich zwischen 25 und $2,5 \times 10^7$ Genomäquivalenten pro Reaktion ab. Die am niedrigsten gemessene Konzentration in einer Patientenprobe waren 10 Genomäquivalente in einer Reaktion aus dem DNA-Eluat einer Urinprobe. Somit ist mit dieser Methode eine Quantifizierung der Adenovirus-DNA ab einer Viruslast von 1000 Genomäquivalenten pro Milliliter aus EDTA-Blut und 600 Genomäquivalenten pro Milliliter aus Blutplasma sicher möglich.

Es wurden auch Proben gefunden, die unterhalb des von der Standardkurve abgedeckten Bereiches lagen, also im Reaktionsansatz weniger als 25 Genomäquivalente enthielten. In diesem Bereich ist allerdings keine sichere Quantifizierung möglich. Die Sensitivität des LightCycler-Ansatzes entspricht somit ungefähr der Sensitivität der konventionellen nested PCR, was auch die große Übereinstimmung der Ergebnisse beider Verfahren zeigt.

Lion et al. erreichten in ihrem Ansatz eine Empfindlichkeit von 2×10^2 Genomäquivalenten pro Milliliter eingesetztem Probenmaterial. Eine verlässliche Quantifizierung war jedoch auch erst ab 1000 Genomäquivalenten pro Milliliter möglich (Lion et al. 2003 [57]). Leruez-Ville et al. berichteten von einer Nachweisgrenze von 10 Genomäquivalenten pro Reaktionsansatz (Leruez-Ville et al. 2004 [55]). In dieser Studie reichten die Ergebnisse von 1×10^3 bis 1×10^8 Genomäquivalenten pro Milliliter Blutplasma.

Zur Überprüfung der LightCycler-PCR dienten verschiedene Patientenproben aus der Routine-Diagnostik. Die Hauptmenge der Patientenproben stammten aus dem Routine-Monitoring von Patienten der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Friedrich-Schiller-Universität Jena nach KMT bzw SZT. Außerdem wurden Augenabstriche untersucht, die von der Klinik für Augenheilkunde der Friedrich-Schiller-Universität Jena eingeschickt wurden. Die höchste Viruslast zeigten Stuhlproben, während die geringsten Virusmengen in Plasmaproben nachgewiesen wurden. Die Ergebnisse der Quantifizierung aus Vollblut- und Plasmaproben ergaben eine hundertprozentige Übereinstimmung mit der etablierten konventionellen nested PCR. Stuhlproben, Tubus- und Trachelabstriche, Mageninhalt, Rachenspülwasser und Knochenmark ergaben ebenfalls eine totale Übereinstimmung mit der konventionellen PCR, während Urinproben, Leberbiopsien, Aszites und Augenabstriche nicht in allen Ergebnissen mit der konventionellen PCR übereinstimmten.

Die Ergebnisdifferenzen lassen sich zum einen mit einer zu geringen Viruslast erklären, die dem LightCycler-PCR entgeht, zum anderen scheinen vor allem bei Urinproben auch Substanzen eine Rolle zu spielen, die die PCR-Reaktion hemmen und durch die DNA-

Präparation nicht eliminiert wurden. Außerdem handelt es sich um eine retrospektive Betrachtung von DNA-Eluaten, die teilweise schon längere Zeit aufbewahrt wurden und dementsprechend häufig aufgetaut und wieder eingefroren wurden. Eine Nichterfassung bestimmter Serotypen erscheint nicht als vordergründig, da andere Probenmaterialien identischer Patienten aus dem gleichen Infektionsverlauf erfasst wurden.

Im Jahr 2000 traten in der Transplantationseinheit der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Friedrich Schiller Universität Jena bei vier Patienten Adenovirusinfektionen auf. Aufgrund dieser Infektionsverläufe wurde eine Quantifizierung der Viruslast interessant. Die Praktikabilität und der Nutzen einer quantitativen Real-Time-PCR sollte in der vorliegenden Arbeit anhand von retrospektiv rekonstruierten Patientenverläufen demonstriert werden.

Insgesamt zeigen die Verläufe disseminierte Infektionen mit humanen Adenoviren. Die erste Patientin (Abbildung 4.19) fiel ab dem 30. Tag mit positiven Ergebnissen aus EDTA-Blutproben auf. Im gesamten Infektionsverlauf zeigte sich eine Tendenz zum Anstieg der Viruslast, die einen maximalen Peak am 58. Tag erreichte ($3,43 \times 10^7$ Geq/ml). Das Mittel der Viruslast von $9,25 \times 10^6$ Geq/ml ist sehr hoch. Es wurde ein Anstieg von mehr als drei log-Stufen erreicht, was für eine große Aktivität der Infektion spricht. Insgesamt konnte im Verlauf in Proben aus vier unterschiedlichen Materialien Adenovirus-DNA nachgewiesen werden. Dies spricht mit hoher Wahrscheinlichkeit für eine disseminierte Infektion mit multipler Organbeteiligung, an der die Patientin schließlich am 49. Tag nach der Transplantation verstarb.

Der Infektionsverlauf der zweiten Patientin ist nicht weniger dramatisch (Abbildung 4.20). Bei dieser Patientin ging die Infektion höchstwahrscheinlich im Rahmen einer hämorrhagischen Zystitis vom Urogenitalsystem aus. Schon am dritten Tag konnte in den ersten Urinproben Adenovirus nachgewiesen werden. Die Viruslast im Urin erreichte ein Maximum von $1,19 \times 10^7$ Geq/ml. Ab dem 28. Tag wird zum ersten Mal auch Adenovirus-DNA im EDTA-Blut nachgewiesen. Die Viruslast stieg schnell auf den Peakwert von $3,08 \times 10^6$ Geq/ml und persistierte auf diesem Level. Bis zum Zeitpunkt des Todes am 44. Tag nach Transplantation konnte Virus-DNA in Plasma und Trachealsekret nachgewiesen werden.

Der dritte Patient bietet den eindrucksvollsten Infektionsverlauf (Abbildung 4.21). Bis zum 14. Tag waren die virologischen Ergebnisse völlig unauffällig. Dann wurden in drei Proben aus unterschiedlichen Materialien gleichzeitig Adenovirus-DNA nachgewiesen (Urin, Rachenspülwasser und Plasma). Die Viruslast im Plasma erreichte mit

einem Mittel von $1,19 \times 10^6$ Geq/ml sehr hohe Werte. Die Viruslast im EDTA-Blut lag im Mittel mit $8,57 \times 10^5$ Geq/ml ein wenig unter den Plasmaproben. Bis zum Tod des Patienten am 49. Tag nach Transplantation konnte aus elf verschiedenen Probenmaterialien Adenovirus-DNA nachgewiesen werden. Die HAdV-Viruslast im Tubusabstrich stieg stetig an, was den Verdacht auf eine durch Adenovirus induzierte Pneumonie aufkommen ließ. Des Weiteren konnte Adenovirus-DNA in Stuhl, Mageninhalt, Aszites, Leberbiopsien, Knochenmark, Rachenspülwasser und Urin nachgewiesen werden.

Mit Hilfe dieser drei Patientenverläufe konnte gezeigt werden, dass die Methode zum Infektionsmonitoring von akuten AdV-Infektion geeignet ist. Ein Anstieg der Viruslast um mehrere log-Stufen belegte nachhaltig die Aktivität der Infektion. Lankaster et al. zeigten in einer Studie von 2002, dass der Anstieg der Viruslast im Plasma die Schwere des Infektionsverlaufes reflektiert (Lankaster et al. 2002 [54]). Bei allen Patienten belegt die hohe Viruslast die große Aktivität der Infektion. Eine hohe Viruslast spricht demnach für eine schlechte Prognose für den Patienten.

Vor allem bei Kindern mit Immundefekt ist es notwendig im Rahmen des Infektionsmonitorings den Nachweis von Adenoviren miteinzuschließen. Echavarria et al. nutzten eine PCR zum Nachweis von Adenovirus-DNA aus Serumproben. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass eine positive Serum-PCR eine disseminierte Infektion vorhersagen kann. Der negative Vorhersagewert der Serum-PCR lag bei 100% (Echavarria et al. 2001 [24]). Leruez-Ville et al. verwendeten die Quantifizierung der Adenoviruslast aus Blutplasma zum Monitoring des Erfolges einer Behandlung mit Cidofovir (Leruez-Ville et al. 2004[55]). In der genannten Studie zeigten fünf der acht behandelten Patienten ein Ansprechen auf Cidofovir, was mit dem Abfall der Viruslast nach erster und zweiter Applikation dokumentiert werden konnte. Außerdem wurde gezeigt, dass die initiale Viruslast bzw. ein schneller Therapiebeginn entscheidend für die Prognose dieser Patienten waren.

Generell erscheint eine Quantifizierung der Viruslast bei wiederholtem Nachweis von Adenovirus und nach dem Auftreten einer klinischen Symptomatik sinnvoll. Mehrere Studien konnten zeigen, dass der Nachweis von Adenovirus aus verschiedenen Organ-systemen ein Hinweis auf eine disseminierte Infektion ist. Da es sehr wahrscheinlich ist, dass die prätherapeutische Viruslast und der frühzeitige Therapiebeginn Einfluss auf das Ansprechen der Therapie hat, ist es umso wichtiger, eine Adenovirusinfektion rechtzeitig zu erfassen. Die Unterscheidung zwischen latenter, nicht aktiver Infektion und einer Reaktivierung bzw. Neuinfektion lässt sich mit Hilfe der Quantifizierung treffen, indem

sich ein Anstieg der Viruslast belegen lässt.

Mit der hier beschriebenen LightCycler-Realtime PCR ist es möglich, eine sichere Aussage zur Viruslast in Blut- und Plasmaproben zu treffen. Die Sensitivität von <1000 Genomäquivalenten pro Milliliter Vollblut bzw. <600 Genomäquivalente pro Milliliter Plasma sollte ausreichen, um den speziellen Anforderungen dieser Patientengruppe zu genügen. Die Quantifizierung von Urinproben brachte keine ausreichend zuverlässigen Ergebnisse. Obwohl Echavarría et al. in einem Fallbericht eine durch Adenovirus verursachte hämorrhagische Zystitis als Manifestation einer disseminierten Erkrankung belegen konnten (Echavarría et al. 1999 [25]), ist das Monitoring von Blut- bzw. Plasmaproben dem Monitoring von Urinproben vorzuziehen.

Eine zusätzliche Untersuchung von Urinproben ist jedoch zur Erfassung einer hämorrhagischen Zystitis sinnvoll, die als wesentliche klinische Manifestation in der erfassten Patientengruppe gilt.

5.3.2 Cytomegalievirus

Infektionen mit CMV spielen beim Management von Patienten nach Transplantationen nach wie vor eine große Rolle. Infektionen innerhalb der ersten Monate nach Transplantation sind, durch die unterschiedlichen Therapieoptionen und dem Prinzip der präemptiven Therapie, meistens kontrollierbar geworden. Im Rahmen einer präemptiven Therapie wird ein engmaschiges Infektionsmonitoring durchgeführt. Im Gegensatz zu einer generellen Prophylaxe, wird hierbei nur bei positiven Ergebnissen im Infektionsmonitoring mit einer antiviralen Therapie begonnen.

Allerdings fallen immer mehr Fälle von CMV-Infektionen mehr als ein Jahr nach der Transplantation auf. Late-onset CMV-Infektionen stellen somit ein zunehmendes Problem dar. Sie rücken, durch die erfolgreichen Therapiestrategien der early-onset CMV-Infektionen nach Stammzelltransplantation bzw. Organtransplantation, immer mehr in den Vordergrund.

Als Gründe spielen verschiedene Faktoren eine Rolle. Zum einen wird durch eine Prophylaxe mit Virostatika oder durch eine Behandlung der früheren CMV-Infektion die Resistenzentwicklung gegenüber antiviral wirksamen Medikamenten begünstigt. Außerdem stellt eine hohe gemessene Viruslast auch ohne klinische Symptome in der frühen Phase nach Transplantation ein Risiko dar, an einer CMV zu erkranken. Aktuell werden deshalb Strategien entwickelt, die der späten Infektion mit CMV nach Organ- bzw. Stammzelltransplantation vorbeugen sollen. Razonable bezeichnete die Entwicklung einer Strategie zur Vorbeugung der Late-onset CMV-Infektion ohne ein Ansteigen der Resistenz gegen antivirale Medikamente als zu erstrebenden Fortschritt bei der Behandlung von Infektionen nach Transplantationen (Razonable 2005 [76]).

Entsprechend der konventionellen nested PCR, auf die der Ansatz für die quantitative Real-Time-PCR beruht, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Genabschnitt aus der IE-Region des Virus amplifiziert. Nitsche et al. verwendeten für ihren Nachweis ebenfalls die IE-Region des Cytomegalievirus (Nitsche et al. 2000 [68]), während Gouarin et al. DNA-Ragmente aus der Region UL83 einsetzten, welche das pp65-Antigen kodiert (Gouarin et al 2004 [34]). Hong et al. verwendeten in ihrem LightCycler-Ansatz Primer für das Glykoprotein B (Hong et al. 2004 [45]) und Kalpoe et al. amplifizierten einen Genabschnitt aus der Immediate-Early-Region (Kalpoe et al. 2004 [48]).

Die Standardreihe der CMV-LightCycler-PCR erfasste einen Bereich von $2,19 \times 10^0$ bis

$2,19 \times 10^6$ Geq pro Reaktionsansatz. Bezogen auf einen Milliliter EDTA-Blut entspricht dies einer sicheren quantitativen Aussage ab 88 Genomäquivalenten, bzw. 53 Geq pro Milliliter Blutplasma. Die am geringsten positive Probe enthielt 5×10^0 Geq in einem $5 \mu\text{l}$ -Ansatz einer EDTA-Blutprobe, das entspricht 200 Geq pro Milliliter EDTA-Blut.

Die Sensitivität ist damit vergleichbar mit anderen Studien. Herrmann et al. untersuchten Plasmaproben und erreichten eine Sensitivität von 40-120 Geq pro Milliliter (Herrmann et al. 2004[42]). Hong et al. berichteten von einem Nachweislimit von 125 Geq pro Milliliter und arbeiteten ebenfalls mit Plasmaproben (Hong et al. 2004 [45]). Kalpoe et al. erreichten eine Sensitivität von 100-250 Geq pro Milliliter aus Plasmaproben (Kalpoe et al. 2004 [48]). Gouarin et al. untersuchten Vollblutproben und gaben ein theoretisches Detektionslimit von 250 Geq pro Milliliter Vollblut an (Gouarin et al. 2004 [34]). Tabelle 5.1 gibt einen Überblick über die Daten von Real-Time-PCR-Ansätzen, die in der Literatur publiziert wurden.

Neben den Ringversuchsproben dienten vor allem Plasma- bzw. EDTA-Blutproben zur Überprüfung der Realtime-PCR. 80% (12) der untersuchten EDTA-Blutproben waren CMV-positiv und konnten quantifiziert werden. Die Viruslast lag im Mittel bei $2,3 \times 10^5$ (2×10^2 - $2,88 \times 10^6$) Geq / ml EDTA-Blut. 82,3 % (14) der quantifizierten Plasmaproben waren CMV-positiv. Die Viruslast lag im Mittel bei $2,65 \times 10^6$ ($1,68 \times 10^2$ - $1,21 \times 10^7$) Geq / ml Plasma. Chen et al. sehen eine Viruslast von mehr als 1×10^3 Genomäquivalenten pro Milliliter als Grenzwert (cut-off value) um eine CMV-Infektion bei chinesischen Kindern vorherzusagen (Chen et al., 2004 [19]).

Für die Qualitätssicherung der Quantifizierung von CMV-DNA standen Proben der Instand-Ringversuche von drei aufeinanderfolgenden Versuchsreihen zur Verfügung. Die Ergebnisse der quantitativen CMV-Realtime-PCR lagen alle im vorgegebenen Referenzbereich. Daraus lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass eine Bestimmung der Viruslast im Laboratoriumsbetrieb mit dieser Methode sicher durchgeführt werden kann.

Ein Monitoring der Viruslast bei Infektionen mit CMV ist bei Patienten mit iatrogen herbeigeführten Immundefekten unbedingt notwendig. Trotz effektiver Therapiestrategien mit Gancyclovir als wirksames antivirales Medikament, stellt die CMV-Infektion immer noch ein großes Problem bei Patienten nach Transplantationen dar. Das Infektionsmonitoring wird in vielen Zentren mittels pp65-Antigenämietest durchgeführt. Gouarin et al. setzten in ihrer Studie eine Zahl von $\log 4,095$ (ca. $1,2 \times 10^4$) Genomäquivalenten

pro Milliliter Blut einem Ergebnis von 50 pp65-positiven Zellen pro 2×10^5 peripheren Blutleukozyten (PBL) gleich (Gouarin et al. 2004 [34]). Die Cut-off-Werte, die eine Infektion anzeigen, sind von der Art der Transplantation abhängig. Bei Patienten nach SZT wurden nach eigenen Erfahrungen selten hohe Ergebnisse im pp65-Antigenämie-Test erreicht, da in der Frühphase nach SZT eine Lymphopenie zu erwarten ist und die völlige Rekonstitution der T-Lymphozyten mehrere Monate dauern kann.

Als Alternative zum pp65-Antigen-Nachweis in PBL bietet sich die Bestimmung der Viruslast mittels quantitativem DNA-Nachweis an. Kalpoe et al. fanden eine gute Korrelation zwischen der Quantifizierung der DNA und dem pp65-Antigen-Nachweis bei Patienten nach Organtransplantation, wobei der Nachweis des Anstieges der Virus-DNA zeitlich immer vor dem Nachweis der pp65-positiven Zellen lag. Kalpoe et al. empfehlen einen Cut-off-Wert von 10^4 Geq pro Milliliter Plasma bei Patienten nach SZT bzw. $6,3 \times 10^3$ Geq pro Milliliter Plasma bei Patienten nach Organtransplantation (Kalpoe et al. 2004 [48]). Diese Grenzwerte liegen um eine log-Stufe höher als die Empfehlungen von Chen et al., die jedoch Patienten ohne Immunsuppression bzw. Immundefekt untersuchten (Chen et al. 2004 [19]). Eine Untersuchung von Plasmaproben mittels PCR erscheint bei dem eigenen Patientengut sinnvoller, weil eine DNAämie mit hoher Wahrscheinlichkeit Ausdruck einer aktiven Infektion ist. Ein wesentlicher Vorteil der DNA-Quantifizierung aus Plasmaproben besteht darin, dass auch in Phasen einer Lymphopenie diagnostisch verwertbare Ergebnisse erwartet werden können. Im Vergleich zur konventionellen PCR lässt sich mit einer Quantifizierung der DNA in Vollblutproben eine aktive CMV-Infektion sicher von einer latenten Infektion unterscheiden.

Howden et al. nutzen in ihrer Studie bei Patienten nach allogener KMT und antiviraler Prophylaxe einen Wert von $\geq 5 \times 10^3$ Geq pro Milliliter Plasma als Grenzwert (Howden et al. 2003 [47]). In früheren Studien hat sich gezeigt, dass eine Viruslast von mehr als 5×10^3 Geq / ml mit einem erhöhten Risiko einer CMV-Erkrankung verbunden ist. Howden et al. fanden einerseits keinen Einfluss der CMV-Viruslast auf Todesfälle innerhalb der ersten hundert Tage nach Transplantation, berichteten jedoch andererseits, dass eine CMV-Viruslast von mehr als 5×10^3 Geq / ml mit Todesfällen nach Tag 100 nach Transplantation assoziiert ist (Howden et al. 2003 [47]).

Tabelle 5.1: Vergleich verschiedener Daten von publizierten Real-Time-PCR-Ansätzen zum Nachweis von CMV-DNA

| | Material | Sensitivität | Region | Gerät |
|------------------------------|--------------------|-------------------------|----------------|----------------|
| <i>Najioullah et al 2001</i> | Serum | 500 Geq/ml | NXFL4 | TaqMan |
| <i>Howden et al. 2003</i> | Plasma | 400 Geq/ml | | COBAS Amplicor |
| <i>Herrmann et al. 2004</i> | Plasma | 40-120 Geq/ml | gB, <i>pol</i> | TaqMan |
| <i>Gouarin et al. 2004</i> | Vollblut | 250 Geq/ml | UL83 | LightCycler |
| <i>Hong et al. 2004</i> | Plasma | 125 Geq/ml | gB | LightCycler |
| <i>Kalpoe et al. 2004</i> | Plasma | 100-250 Geq/ml | IE | TaqMan |
| <i>eigener Ansatz</i> | Plasma Vollblut | 72 Geq/ml 120 Geq/ml | IE | LightCycler |

5.3.3 Parvovirus B19

Als Grundlage für die Etablierung einer LightCycler-PCR wurden modifizierte Primerpaare der konventionellen nested PCR genutzt, die im klinischen Routinebetrieb verwendet wurden (Salimans et al 1989 [82]). Hierbei erfolgte die Amplifizierung eines Abschnittes aus der VP1-Genregion des Virus. Im Vergleich dazu wiesen Harder et al. ebenfalls im LightCycler, eine Gensequenz aus der NS1-Genregion des Virus nach (Harder et al. 2001 [38]).

Die Standardkurve der etablierten LightCycler-PCR ermöglichte einen Nachweis von 5×10^0 bis 5×10^6 Geq pro Ansatz. Die geringste Viruslast wurde in einer Myokardbiopsie gemessen. Damit war eine Quantifizierung ab 200 Geq pro Milliliter EDTA-Blut, bzw. 120 Geq pro Milliliter Plasma möglich. Harder et al. erreichten in ihrer LightCycler-PCR eine Sensitivität von 5 Geq pro Reaktionsansatz, was 250 Geq pro Milliliter Plasma entspricht (Harder et al. 2001 [38]). Zur Überprüfung der Real-Time-PCR dienten ebenfalls Patientenproben. Neben den Proben aus den Ringversuchen wurden vor allem DNA-Eluats aus Myokardbiopsien, EDTA-Blut und Plasma verwendet. Insgesamt enthielten die Myokardbiopsien die geringste Viruslast, im Mittel lediglich $1,33 \times 10^1$ Genomäquivalente pro eingesetztem Microliter des DNA-Eluats. Die Sensitivität der Methode war ausreichend um diese geringen Mengen an Virus-DNA aus Myokardbiopsien zu erfassen. Die klinische Bedeutung dieser Befunde sollte jedoch kritisch beurteilt werden. Plasma- und EDTA-Blutproben enthielten im Mittel ca. 5×10^2 Geq pro Microliter des eingesetzten DNA-Eluats. Dies entspricht auf einen Milliliter EDTA-Blut $9,96 \times 10^4$ Geq / ml ($1,1 \times 10^4$ - $3,52 \times 10^5$ Geq / ml) bzw. $6,07 \times 10^5$ ($1,99 \times 10^3$ - $2,47 \times 10^6$) Geq / ml Plasma. Zur Qualitätssicherung der Quantifizierung von Parvovirus B19-DNA standen ebenfalls Instand-Ringversuche zur Verfügung. Die Überprüfung der Realtime-PCR erfolgte wiederum durch die Teilnahme an drei aufeinanderfolgenden Versuchsreihen. Mit der entwickelten Methode wurden sämtliche Proben korrekt bewertet. Dadurch sind die Voraussetzungen gegeben, diese Methode im klinischen Alltag einsetzen zu können.

Ein Monitoring der Patienten nach SZT oder KMT auf Parvovirus B19-DNA in Blut- und Plasmaproben erweist sich als notwendig, da dieses Virus in einigen Fällen bei immungeschwächten Patienten eine chronisch-persistierende Infektion mit rezidivierenden aplastischen Krisen verursachen kann. Harder et al. berichteten von einem Patienten, der nach Immunsuppression eine Parvovirus B19-Infektion mit einer schweren aplastischen Krise und einer schweren systemischen Entzündungsreaktion entwickelte. Bei die-

sem Infektionsverlauf war die Weiterführung der immunsuppressiven Therapie nicht mehr möglich. Aufgrund der Anämie war die Applikation mehrere Erythrozytenkonzentrate notwendig. Außerdem wurde die Infektion mit Immunglobulinen behandelt. Das Monitoring erfolgte aus Serumproben, die maximale Viruslast war $3,2 \times 10^9$ Geq / ml Serum (Harder et al. 2001 [38]). Plentz et al. beschrieben den Infektionsverlauf eines Patienten nach KMT. In diesem Fall wurden ebenfalls Serumproben zum Monitoring verwendet. Die Viruslast erreichte Werte bis 1×10^{12} Geq / ml (Plentz et al. 2004 [73]). Obwohl die serologische Diagnostik relativ häufig zur Diagnose von Parvovirus B19-Infektionen eingesetzt wird, ist sie bei diesen Patienten nicht immer verlässlich, da immunsupprimierten Patienten die Fähigkeit fehlt, im ausreichenden Maße Antikörper zu bilden.

Wie auch bei den vorher besprochenen Viren ist bei diesem Krankheitsbild ein Monitoring des Infektionsverlaufes in Plasmaproben sinnvoll. Schwere disseminierte Infektionen mit Parvovirus B19 mit einer hohen Mortalität wurden bislang nicht beschrieben. Bei Patienten nach Organtransplantation oder nach immunsuppressiver Therapie besteht allerdings die Gefahr eine Knochenmarksaplasie zu entwickeln (Young et al. 2004 [109]). Eine Quantifizierung der Viruslast erscheint nur beim Auftreten von akuten klinisch symptomatischen Verläufen, die schwer beherrschbar sind, angezeigt. Außerdem ist die Quantifizierung der Viruslast zur Kontrolle der Therapie wertvoll (Plentz et al. 2004 [73]).

5.4 Ergebnisse und deren Anwendbarkeit

5.4.1 Patientenverläufe

Bei den Patientenverläufen handelte es sich ausschließlich um retrospektive Verläufe. Die Virusdiagnostik zum Zeitpunkt der Probenentnahmen war ausschließlich mit der hauseigenen *nested* PCR durchgeführt worden. Die gefundenen Ergebnisse der Quantifizierung hatten keinen direkten Einfluss auf Entscheidungen im Management der Infektion. Desweiteren muß bedacht werden, dass die untersuchten Probenmaterialien nicht für dieses Verfahren optimiert waren. Im Falle einer prospektiven Anwendung dieser Methode ist zu fordern, die Proben zu standardisieren, indem z.B. DNA aus einer auf eine bestimmte Zellzahl eingestellten Probe isoliert wird (z.B. Genomäquivalente pro 10^5 Leukozyten). Bei EDTA-Blut sollte das Ergebnis auf die Menge der eingesetzten Gesamt-DNA bezogen werden, während bei Plasmaproben die Kopienzahl pro Milliliter Plasma ausreicht. Hier ist es notwendig im Rahmen einer Weiterführung geeignete Probenmaterialien zu evaluieren und die Ergebnisse der *LightCycler*-PCR in Bezug zu den klinischen Verläufen zu stellen.

5.4.2 Anwendungsmöglichkeiten

Durch die Quantifizierung von Virus-DNA wird es möglich, den Verlauf einer Infektion quantitativ zu verfolgen. Dies ist im Hinblick auf das Disease-Management von besonderer Bedeutung. So kann man theoretisch sofort auf eine Zunahme der Viruslast reagieren und erkennt ein Ansprechen auf eine Therapie. Von besonderem Vorteil ist in dieser Hinsicht die sehr kurze Zeitspanne, die bei der Quantifizierung mit dem *LightCycler*-System benötigt wird. Man kann sehr schnell auf Änderungen der Viruslast reagieren.

Eine Darstellung der Infektionsverläufe ist auch für die Validierung von antiviralen Therapeutika von sehr großem Nutzen. Man kann im Verlauf erkennen, ob die Viruslast nach Medikamentengabe abnimmt oder nicht. Diese Möglichkeit gewinnt um so mehr an Bedeutung, weil sehr wenige antiviral wirksame Medikamente verfügbar sind. Mit der konsequenten Nutzung einer quantitativen Nachweismethode sind Auswirkungen der Therapie auf den Infektionsverlauf (im Sinne einer Reduktion der Viruslast) und mögliche Resistenzen, die zu keinem Abfall der Viruslast führen, schnell zu erkennen.

Bei immunsupprimierten Patienten wird ein Basismonitoring auf verschiedenste Infektionserreger durchgeführt. Es erscheint aufgrund des hohen Kostenaufwandes nicht sinnvoll, sämtliche Patientenproben einer Quantifizierung zuzuführen. Vielmehr sollte

das Basismonitoring weiterhin mit einer konventionellen PCR-Methode durchgeführt werden. Treten im Rahmen dieser Untersuchungen Virus-positive Ergebnisse in geeigneten Probenmaterialien auf und ist der Patient symptomatisch erkrankt, sollten diese quantifiziert werden, um die Viruslast zu beurteilen und eine Dynamik in der Veränderung der Viruslast zu erkennen. Im Rahmen dieses Infektionsverlaufes kann schnell auf die Veränderung der Viruslast reagiert werden, z.B. im Sinne einer Therapieoptimierung oder Modifikation der immunsuppressiven Therapie. Da die antivirale Therapie mit Nebenwirkungen verbunden ist, besteht durch ein besseres Therapiemangement die Möglichkeit, die antivirale Therapie zum frühest möglichen Zeitpunkt zu beenden.

Die schnelle Durchführbarkeit der LightCycler-Methode kann von großem klinischen Nutzen sein. In Situationen, bei denen es auf eine sehr schnelle Therapieentscheidung ankommt, ist sie anderen Methoden deutlich überlegen. Bei der Virusanzucht dauert es mehrere Tage, bis ein Ergebnis zu erwarten ist. Serologische Methoden sind nicht immer durchführbar, und das Vorliegen einer akuten Infektion ist nicht immer klar zu interpretieren, vor allem bei immunsupprimierten Patienten. Die Durchführung der konventionellen nested PCR benötigt zwei aufeinanderfolgende, mehrere Stunden dauernde PCR-Reaktionen. Sie ist relativ preisgünstig aber kontaminationsanfällig. Mit Durchführung der Realtime-PCR im LightCycler ist es möglich innerhalb von zwei Stunden zu einem Ergebnis zu kommen. Eine qualitative, sogar semiquantitative Aussage über den Virusnachweis ist schon während des Reaktionsablaufes am Monitor abzulesen.

Zur Beurteilung von Infektionsverläufen oder bei Fragen eines Therapieansprechens oder -versagens sind Quantifizierungen der Viruslast von großem Nutzen. Die in dieser Arbeit behandelten Viren weisen eine hohe Durchseuchung in der Bevölkerung auf. Außerdem verursachen sie persistierende Infektionen, die in Phasen der Immuninkompetenz reaktiviert werden können. Serologische Antikörperbestimmungen sind zumindest in der Anfangsphase nach Transplantation nicht sinnvoll. Um eine Aussage über die Dynamik des Infektionsverlaufes und der Virusreplikation zu erhalten, reichen einfache qualitative PCR-Methoden nicht mehr aus. Deshalb ist vor allem bei Patienten nach Transplantationen und unter Immunsuppression, zur Vorhersage schwerer Krankheitsverläufe, eine Quantifizierung der Virus-DNA sinnvoll. Hierbei stellen die quantitativen Real-Time-PCR-Methoden ein sensitives und verlässliches Werkzeug dar, um die Schwere der Infektionsverläufe und ihre Dynamik beurteilen zu können.

6 Schlussfolgerungen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Ansatz einer Real-Time-PCR entwickelt, der auf drei unterschiedliche DNA-Viren übertragen wurde, die vor allem von besonderer Bedeutung bei immunsuprimierten Patienten sind.

Um eine Vergleichbarkeit zu anderen publizierten Methoden zu erreichen, war eine standardisierte Referenz-DNA notwendig. Für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten DNA-Viren stand bis zum Abschluss der Arbeit noch keine standardisierte Referenz-DNA zur Verfügung. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden eigene Referenzen auf Plasmid-Basis erarbeitet, die zur Erstellung einer Eichkurve dienten. Hierbei wurden die nachzuweisenden Genfragmente von CMV, humanen AdV und Parvovirus B19 in pUC19 kloniert.

Für die Real-Time-PCR zum Nachweis von DNA humaner AdV wurden Primer- und Sondenpaare erarbeitet, die sämtliche in GenBank publizierten AdV-Serotypen erfassen. Außerdem wurden Sequenzanalysen mehrerer AdV-Positiver Patienten einbezogen. Die etablierte LC-Real-Time-PCR wurde anhand verschiedenster Probenmaterialien von unterschiedlichen Patienten überprüft und erreichte eine gute Übereinstimmung mit der konventionellen PCR. Eine vollständige Untersuchung von Proben sämtlicher Serotypen konnte nicht umgesetzt werden. Zukünftig sollten DNA-Proben aller AdV-Serotypen untersucht werden, um die Funktion dieser Real-Time-PCR zu bestätigen. Zusammenfassend ist die LC-Real-Time-PCR zur Virus-Last-Bestimmung von AdV aus verschiedenen Probenmaterialien geeignet. Speziell für die Gruppe der KMT- bzw. SZT-Empfänger kann eine schnelle Viruslast-Bestimmung von AdV ein großer Vorteil im weiteren Krankheitsverlauf darstellen.

Die LC-Real-Time-PCR zum CMV-Nachweis basierte auf dem Primer-Design der erprobten konventionellen nested PCR. Zur Funktionsüberprüfung wurden Patientenproben aus dem klinischen Routinebetrieb untersucht. Hierbei ergab sich eine gute Übereinstimmung mit der konventionellen PCR. Auch anhand eines Patientenverlaufes wurde die Praktikabilität der Methode gezeigt. Außerdem erfolgte eine Überprüfung der LC-Real-Time-PCR anhand vom Instand-Ringversuch. In diesen Versuchsreihen wurden alle

Proben korrekt beurteilt. Somit handelt es sich um eine Nachweisverfahren, welches im klinischen Alltag einsetzbar ist.

Die Methode zur Quantifizierung von Parvovirus B19-DNA basierte ebenfalls auf der im Institut für Virologie und Antivirale Therapie eingesetzten konventionellen PCR. Die Überprüfung anhand von klinischen Proben ergab im Vergleich zur konventionellen PCR eine gute Übereinstimmung. Es erfolgte ebenfalls die Überprüfung anhand vom Instand-Ringversuch. Es wurden alle Proben der verschiedenen Versuchsreihen korrekt beurteilt. Die Anwendung dieser LC-Real-Time-PCR-Methode in der klinischen Diagnostik erscheint möglich.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden drei sensitive Real-Time-PCR-Ansätze für den LightCycler etabliert, die sich vor allem im klinischen Monitoring bei immunsupprimierten Patienten eingesetzt, als wertvoll erweisen könnten.

Durch die Quantifizierung von Virus-DNA in Bezug auf die klinischen Daten der einzelnen Patienten lassen sich die Dynamiken, die im Verlauf solcher komplexen Vorgänge eine Rolle spielen, genauestens untersuchen. Der direkte Effekt von antiviral wirksamen Medikamenten kann anhand der Änderung der Viruslast direkt erprobt und untersucht werden. Präemptive Therapieschemata können durch diese sensitiven Methoden genauer gesteuert werden. Es wird durch genaue Kontrolle der Viruslastveränderungen möglich, eine Reduktion der Immunsuppression anzustreben bzw. die Dauer einer notwendigen, nebenwirkungsreichen antiviralen Therapie zu verkürzen.

Tabellenverzeichnis

| | | |
|------|--|----|
| 3.1 | Verwendete Patientenproben | 23 |
| 3.2 | Verwendete Geräte | 24 |
| 3.3 | Verwendete Bakterien | 25 |
| 3.4 | Verwendete Chemikalien | 26 |
| 3.5 | DNA-Marker | 26 |
| 3.6 | Enzyme | 27 |
| 3.7 | Verwendete Kitsysteme | 27 |
| 3.8 | Lösungen und Puffer | 28 |
| 3.9 | Verwendete PCR-Primer | 32 |
| 3.10 | Empfohlene Temperatur- und Zeitparameter für die <i>LightCycler</i> PCR | 39 |
| 4.1 | Klonierungsprimer | 48 |
| 4.2 | Verwendete Primer und Sonden | 52 |
| 4.3 | Standardkurvenberechnung | 57 |
| 4.4 | Ergebnisse der Adenovirus PCR im LightCycler | 62 |
| 4.5 | Genomäquivalente in den einzelnen Probenmaterialien | 63 |
| 4.6 | Schmelzpunktanalyse | 64 |
| 4.7 | Ringversuch CMV | 72 |
| 4.8 | Patientenproben CMV | 72 |
| 4.9 | Ringversuch Parvovirus B19 | 77 |
| 4.10 | Patientenproben Parvovirus B19 | 78 |
| 5.1 | Vergleich verschiedener Daten von publizierten Real-Time-PCR-Ansätzen zum Nachweis von CMV-DNA | 92 |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|------|---|----|
| 1.1 | Glaskapillaren | 17 |
| 1.2 | FRET | 18 |
| 1.3 | LightCycler Kinetik | 19 |
| 3.1 | pUC19 | 25 |
| 3.2 | Berechnung der DNA-Konzentration | 30 |
| 3.3 | Berechnung der Plasmid-Konzentration | 36 |
| 3.4 | Schmelzpunktanalyse mit LightCycler Software Version 3.5 | 42 |
| 4.1 | Klonierungsstrategie für HAdV-Referenz-DNA | 44 |
| 4.2 | Plasmid-Verdünnungsreihe pUC[HAdV2-hexon | 45 |
| 4.3 | Klonierungsstrategie für CMV-Referenz-DNA | 45 |
| 4.4 | Klonierungsstrategie für Parvovirus B19-Referenz-DNA | 47 |
| 4.5 | Verdünnungsreihe | 47 |
| 4.6 | Sequenzierung | 50 |
| 4.7 | CMV LightCycler-PCR: Sondendesign | 51 |
| 4.8 | Adenovirus LightCycler-PCR: Platzierung von Sonden und Primer | 53 |
| 4.9 | CMV-LightCycler-PCR: Platzierung der Sonden und Primer | 55 |
| 4.10 | Parvovirus B19 LightCycler-PCR: Platzierung der Sonden und Primer | 56 |
| 4.11 | Standardkurve der Adenovirus-LC-PCR | 58 |
| 4.12 | Adenovirus Standardkurve: Regressionsgerade | 58 |
| 4.13 | Standardkurve der Cytomegalievirus-LC-PCR | 59 |
| 4.14 | CMV Standardkurve: Regressionsgerade | 59 |
| 4.15 | Standardkurve der Parvovirus B19-LC-PCR | 60 |
| 4.16 | Parvovirus B19 Standardkurve: Regressionsgerade | 60 |
| 4.17 | Reproduzierbarkeit der Adenovirus LC-PCR | 61 |
| 4.18 | Schmelzpunktanalyse | 65 |
| 4.19 | Patientenverlauf 1 | 67 |
| 4.20 | Patientenverlauf 2 | 68 |

| | |
|---|----|
| 4.21 Patientenverlauf 3 | 70 |
| 4.22 Reproduzierbarkeit der CMV LC-PCR | 71 |
| 4.23 Patientenverlauf | 74 |
| 4.24 Reproduzierbarkeit der Parvovirus B19 LC-PCR | 75 |

Literaturverzeichnis

- [1] AMBINDER, R. F., BURNS, W., FORMAN, M., ET AL. Hemorrhagic cystitis associated with adenovirus infection in bone marrow transplantation. *Archives of Internal Medicine* 146 (1986), (1400–1401).
- [2] ANDERSON, M. J., TSOU, C., PARKER, R. A., ET AL. Detection of antibodies and antigens of human parvovirus B19 by enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology* 24 (1986), (522–526).
- [3] AONO, T., KONDO, K., ET AL. Monitoring of Human Cytomegalovirus Infections in Pediatric Bone Marrow Transplant Recipients by Nucleic Acid Sequence-Based Amplification. *The Journal of Infectious Diseases* 178 (1998), (1244–1249).
- [4] ARAV-BOGER, R., ECHAVARRIA, M., ET AL. Clearance of adenoviral hepatitis with ribavirin therapy in a pediatric liver transplant recipient. *Pediatric Infectious Disease* 19 (2000), 1097–1100.
- [5] AZZI, A., FANCI, R., CIAPPI, S., ET AL. Human parvovirus B19 infection in bone marrow transplantation patients. *American Journal of Hematology* 44 (1993), (207–209).
- [6] BALDWIN, A., KINGSMAN, H., ET AL. Outcome and clinical course of 100 patients with adenovirus infection following bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 26 (2000), 1333–1338.
- [7] BERG, J., NAGEL, V., ET AL. Single-tube two-round polymerase chain reaction using the LightCyclerTM instrument. *Journal of Clinical Virology* 20 (2001), (71–75).
- [8] BOECKH, M., AND BOVIN, G. Quantitation of Cytomegalovirus: Methodologic Aspects and Clinical Applications. *Clinical Microbiology Reviews* 11, 3 (July 1998), (533–554).
- [9] BOECKH, M., GOOLEY, T. A., ET AL. Cytomegalovirus pp65 antigenemia-guided early treatment with ganciclovir versus ganciclovir at engraftment after allogeneic bone marrow transplantation: A randomized double-blind study. *Blood* 88 (1996), 4063–4071.
- [10] BOECKH, M., AND NICHOLS, W. G. The impact of cytomegalovirus serostatus of donor and recipient before hematopoietic stem cell transplantation in the era of prophylaxis and preemptive treatment. *Blood* 103 (2004), 2003–2008.

-
- [11] BOECKH, M., NICHOLS, W. G., ET AL. Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients: Current status, known challenges, and future strategies. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 9 (2003), 543–558.
- [12] BOECKH, M., W. LEISENRING, ET AL. Late cytomegalovirus disease and mortality in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants: Importance of viral load and t-cell immunity. *Blood* 101 (2003), 407–414.
- [13] BROLIDEN, K. Parvovirus b19 infection in pediatric solid-organ and bone marrow transplantation. *Pediatric Transplantation* 5 (2001), 320–330.
- [14] BROLIDEN, K., TOLFVENSTAM, T., ET AL. Persistent b10 parvovirus infection in pediatric malignancies. *Medical and Pediatric Oncology* 31 (1998), 66–72.
- [15] BRUNO, B., GOOLEY, T., ET AL. Adenovirus infection in hematopoietic stem cell transplantation: Effect of ganciclovir and impact on survival. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 9 (2003), 341–352.
- [16] CABALLERO, O. L., MENEZES, C. L. P., VILLA, L. L., AND SIMPSON, A. J. G. A novel, internally competitive polymerase chain reaction for quantification of Human Cytomegalovirus DNA in human leukocytes. *Molecular and Cellular Probes* 14 (April 1999), (407–413).
- [17] CARRIGAN, D. R. Adenovirus infection in immunocompromised patients. *American Journal of Medicine* 102, 3A (March 1997), (71–74).
- [18] CHAKRABARTI, S., MAUTNER, V., ET AL. Adenovirus infections following allogeneic stem cell transplantation: Incidence and outcome in relation to graft manipulation, immunosuppression, and immune recovery. *Blood* 100 (2002), 1619–1627.
- [19] CHEN, F. H., SAMSON, K. T., ET AL. Clinical applications of real-time PCR for diagnosis and treatment of human cytomegalovirus infection in children. *Pediatric Allergy And Immunology* 15 (2004), 210–215.
- [20] COHEN, B. J., AND BUCKLEY, M. M. The prevalence of antibody to human parvovirus B19 in England and Wales. *Journal of Medical Microbiology* 25 (1988), (151–153).
- [21] COOPER, R. J., HALLET, R., ET AL. The epidemiology of adenovirus infections in greater manchester, UK 1982-1996. *Epidemiology and Infection* 125 (2000), 333–345.
- [22] CRADDOCK, C., SZYDLO, R. M., ET AL. Cytomegalovirus seropositivity adversely influences outcome after t-depleted unrelated donor transplant in patients with chronic myeloid leukaemia: The case for tailored graft-versus-host disease prophylaxis. *British Journal of Hematology* 112 (2001), 228–236.

-
- [23] DINI, G., CASTAGNOLA, E., ET AL. Infections after stem cell transplantation in children: State of the art and recommendations. *Bone Marrow Transplantation* 28, Suppl. 1 (2001), S18–S21.
- [24] ECHAVARRIA, M., FORMAN, M., ET AL. Prediction of severe disseminated adenovirus infection by serum PCR. *The Lancet* 358 (2001), 384–385.
- [25] ECHAVARRIA, M. S., RAY, S. C., ET AL. PCR detection of adenovirus in a bone marrow transplant recipient: hemorrhagic cystitis as a presenting manifestation of disseminated disease. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 3 (March 1999), (686–689).
- [26] EINSELE, H., BERTZ, H., ET AL. Infectious complications after allogeneic stem cell transplantation: Epidemiology and interventional therapy strategies. *Annals of Hematology* 82 (Suppl. 2) (2003), S175–S185.
- [27] EMERY, V. C. Viral Dynamics during Active Cytomegalovirus Infection and Pathology. *Intervirology* 42 (1999), (405–411).
- [28] EMERY, V. C., SABIN, C. A., ET AL. Application of viral-load kinetics to identify patients who develop cytomegalovirus disease after transplantation. *The Lancet* 355 (2000), 2032–2036.
- [29] EPSY, M. J., UHL, J. R., ET AL. Diagnosis of Herpes Simplex Virus Infections in the Clinical Laboratory by LightCycler PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 2 (February 2000), (795–799).
- [30] F. WATZINGER, M. S., ET AL. Real-time quantitative PCR assays for detection and monitoring of pathogenic human viruses in immunosuppressed pediatric patients. *Journal of Clinical Microbiology* 42 (2004), 5189–5198.
- [31] FLOMENBERG, P., BABBITT, J., ET AL. Increasing incidence of adenovirus disease in bone marrow transplant recipients. *The Journal of Infectious Disease* 169, 4 (April 1994), (775–781).
- [32] GÉRARD, L., LEPORT, C., FLANDRE, P., ET AL. Cytomegalovirus (CMV) viremia and the CD4+ lymphocyte count as predictors of CMV disease in patients infected with immunodeficiency virus. *Clinical Infectious Diseases* 24 (1997), (836–840).
- [33] GOLD, D., AND COREY, L. Acyclovir prophylaxis for herpes simplex virus infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 31 (1987), 361–367.
- [34] GOUARIN, S., VABRET, A., ET AL. Quantitative analysis of HCMV DNA load in whole blood of renal transplant patients using real-time PCR assay. *Journal of Clinical Virology* 29 (2004), 194–201.

-
- [35] GOZLAN, J., LAPORTE, J. P., LESAGE, S., ET AL. Monitoring of Cytomegalovirus Infection and Disease in Bone Marrow Recipients by Reverse Transcription-PCR and Comparison with PCR and Blood and Urine Cultures. *Journal of Clinical Microbiology* 34, 9 (September 1996), (2085–2088).
- [36] GUIDOZZI, F., BALLOT, D., ET AL. Human b19 parvovirus infection in an obstetric population: A prospective study determining fetal outcome. *Journal of Reproductive Medicine* 39 (1994), 36–38.
- [37] HALE, G. A., HESLOP, H. E., ET AL. Adenovirus infection after pediatric bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 23, 3 (February 1999), (277–282).
- [38] HARDER, T. C., HUFNAGEL, M., ZAHN, K., ET AL. New LightCycler PCR for Rapid and Sensitive Quantification of Parvovirus B19 DNA Guides Therapeutic Decision-Making in Relapsing Infections. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 12 (2001), (4413–4419).
- [39] HEBART, H., AND EINSELE, H. Specific infectious complications after stem cell transplantation. *Supportive Care in Cancer* 12 (2004), 80–85.
- [40] HEEGAARD, E. D., AND BROWN, K. E. Human Parvovirus B19. *Clinical Microbiology Reviews* 15, 3 (2002), (485–505).
- [41] HEIM, A., EBNET, C., ET AL. Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR. *Journal of Medical Virology* 70 (2003), 228–239.
- [42] HERRMANN, B., LARSSON, V. C., ET AL. Comparison of a duplex quantitative real-time PCR assay and the COBAS amplicor CMV monitor test for detection of cytomegalovirus. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 5 (2004), 1909–1914.
- [43] HIERHOLZER, J. C. Adenoviruses in the immunocompromised host. *Clinical Microbiology Review* 5 (1992), (262–274).
- [44] HOFFMAN, J. A., SHAH, A. J., ET AL. Adenoviral infections and a prospective trial of cidofovir in pediatric hematopoietic stem cell transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 7 (2001), 388–394.
- [45] HONG, K. M., NAJJAR, H., ET AL. Quantitative real-time PCR with automated sample preparation for diagnosis and monitoring of cytomegalovirus infection in bone marrow transplant patients. *Clinical Chemistry* 50 (2004), 846–856.
- [46] HOWARD, D. S., PHILLIPS, I. G., ET AL. Adenovirus infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clinical Infectious Disease* 29 (1999), 1494–1501.
- [47] HOWDEN, B. P., MICHAELIDES, A., ET AL. Cytomegalovirus viral load monitoring after allogeneic bone marrow transplantation in patients receiving antiviral prophylaxis. *Bone Marrow Transplantation* 32 (2003), 795–800.

- [48] KALPOE, J. S., KROES, A. C., ET AL. Validation of clinical application of cytomegalovirus plasma DNA load measurement and definition of treatment criteria by analysis of correlation to antigen detection. *Journal of Clinical Microbiology* 42(10) (2004), 1498–1504.
- [49] KE, D., MÉNARD, C., ET AL. Development of Conventional and Real-Time PCR Assays for the Rapid Detection of Group B Streptococci. *Clinical Chemistry* 46, 3 (2000), (324–331).
- [50] KELLY, H. A., SIEBERT, D., HAMMOND, R., ET AL. The age-specific prevalence of human parvovirus immunity in Victoria, Australia compared with other parts of the world. *Epidemiological Infection* 124 (2000), (449–457).
- [51] KIM, D. H., KIM, J. G., ET AL. Risk factors for late cytomegalovirus infection after allogeneic stem cell transplantation using HLA-matched sibling donor: Donor lymphocyte infusion and previous history of early CMV infection. *Bone Marrow Transplantation* 34 (2004), 21–27.
- [52] KREUZER, K.-A., BOHN, A., ET AL. Influence of DNA polymerases on quantitative PCR results using the TaqManTMprobe format in the LightCyclerTMinstrument. *Molecular and Cellular Probes* 14 (2000), (57–60).
- [53] L. E. SEARS, L. S. M., ET AL. Circum vent thermal cycle sequencing and alternative manual and automated DNA sequencing protocols using the highly thermostable VentR (exo-) DNA polymerase. *Biotechniques* 13, 4 (1992), 626–33.
- [54] LANKASTER, A. C., VA TOL, M. J. D., CLAAS, E. C. J., ET AL. Quantification of Adenovirus DNA in Plasma for Management of Infection in Stem Cell Graft Recipients. *Clinical Infectious Diseases* 34 (2002), (864–867).
- [55] LERUEZ-VILLE, M., MINARD, V., ET AL. Real-time blood plasma polymerase chain reaction for management of disseminated adenovirus infection. *Clinical Infectious Diseases* 38 (2004), 45–52.
- [56] LEUNG, A. Y., CHAN, M., ET AL. Quantification of adenovirus in the lower respiratory tract of patients without clinical adenovirus-related respiratory disease. *Clinical Infectious Diseases* 40, 10 (May 2005), 1541–1544.
- [57] LION, T., BAUMGARTINGER, R., WATZINGER, F., ET AL. Molecular monitoring of adenovirus in peripheral blood after allogeneic bone marrow transplantation permits early diagnosis of disseminated disease. *Blood* 102 (2003), 1114–1120.
- [58] LJUNGMAN, P. Treatment of adenovirus infection in the immunocompromised host. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 23 (2004), 583–588.
- [59] LJUNGMAN, P., DELILIERS, G. L., ET AL. Cidofovir for cytomegalovirus infection and disease in allogeneic stem cell transplant recipients. *Blood* 97 (2001), 388–392.

-
- [60] LJUNGMAN, P., ENGELHARD, D., ET AL. Treatment of interstitial pneumonitis due to CMV with ganciclovir and intravenous immune globulin: Experience of european bone marrow transplant group. *Clinical Infectious Diseases* 14 (1992), 831.
- [61] LJUNGMAN, P., GRIFFITHS, P., AND PAYA, C. Definitions of Cytomegalovirus Infection and Disease in Transplant Recipients. *Clinical Infectious Diseases* 34 (2002), (1094–1097).
- [62] MAZZULLI, T., DREW, L. W., YEN-LIEBERMAN, B., ET AL. Multicenter Comparison of the Digene Hybrid Capture CMV DNA Assay (Version 2.0), the pp65 Antigenemia Assay, and Cell Culture for Detection of Cytomegalovirus Viremia. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 4 (April 1999), (958–963).
- [63] MCGLAIVE, P. B., SHU, X. O., ET AL. Unrelated donor marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia: 9 years experience of the national marrow donor program. *Blood* 95 (2000), 2219–2225.
- [64] MCOMISH, F., YAP, P. L., ET AL. Detection of parvovirus b19 in donated blood: A model system for screening by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 31 (1993), 323–328.
- [65] MEIJER, E., BOLAND, G. J., ET AL. Prevention of cytomegalovirus disease in recipients of allogeneic stem cell transplants. *Clinical Microbiology Reviews* 16 (2003), 647–657.
- [66] NAJIOULLAH, F., THOUVENOT, D., AND LINA, B. Development of a real-time PCR procedure including an internal control for the measurement of HCMV viral load. *Journal of Virological Methods* 92 (2001), (55–64).
- [67] NICHOLSON, V. A., WHIMBEY, E., ET AL. Comparison of cytomegalovirus antigenemia and shell vial culture in allogeneic marrow transplant recipients receiving ganciclovir prophylaxis. *Bone Marrow Transplantation* 19 (1997), 37–41.
- [68] NITSCHKE, A., STEUER, N., SCHMIDT, C. A., LAND, O., ELLERBROK, H., PAUL, G., AND SIEGERT, W. Detection of Human Cytomegalovirus DNA by Real-Time-Quantitative PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 7 (July 2000), (2734–2737).
- [69] PANG, X. L., CHUI, L., ET AL. Comparison of LightCycler-based PCR, COBAS amplicor CMV monitor, and pp65 antigenemia assays for quantitative measurement of cytomegalovirus viral load in peripheral blood specimens from patients after solid organ transplantation. *Journal of Clinical Microbiology* 41 (2003), 3167–3174.
- [70] PAUSCHINGER, M., BOWLES, N. E., FUENTES-GARCIA, F. J., ET AL. Konventionelle Adenovirus PCR- Originaltitel muß noch eingefügt werden! *Circulation* 99, 10 (1999), (1348–1354).

-
- [71] PEGGS, K. S., PREISER, W., ET AL. Extended routine polymerase chain reaction surveillance and pre-emptive antiviral therapy for cytomegalovirus after allogeneic transplantation. *British Journal of Haematology* 111 (2000), 782–790.
- [72] PELLEGRIN, I., GARRIGUE, I., BINQUET, C., ET AL. Evaluation of New Quantitative Assays for Diagnosis and Monitoring of Cytomegalovirus Disease in Human Immunodeficiency Virus-Positive Patients. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 10 (October 1999), (3124–3132).
- [73] PLENTZ, A., HAHN, J., ET AL. Long-term parvovirus b19 viraemia associated with pure red cell aplasia after allogeneic bone marrow transplantation. *Journal of Clinical Virology* 31 (2004), 16–19.
- [74] PREISER, W., BRÄUNINGER, S., ET AL. Evaluation of diagnostic methods for the detection of cytomegalovirus in recipients of allogeneic stem cell transplants. *Journal of Clinical Virology* 20 (2001), (59–70).
- [75] PREISER, W., BRINK, N. S., ET AL. Development and clinical application of a fully controlled quantitative PCR assay for cell-free cytomegalovirus in human plasma. *Journal of Clinical Virology* 26(1) (2003), 49–59.
- [76] RAZONABLE, R. R. Epidemiology of cytomegalovirus disease in solid organ and hematopoietic stem cell transplant recipients. *American Journal of Health-System Pharmacy* 62 (Suppl 1) (2005), S7–13.
- [77] REUSSER, P. *Supportive Care in Cancer: A Handbook for Oncologists*. J. Klastersky, S.C. Schimpff and H. J. Senn, 1999, ch. Management of Viral Infections, pp. 87–112.
- [78] REUSSER, P. Challenges and options in the management of viral infections after stem cell transplantation. *Support Care Cancer* 10 (2002), 197–203.
- [79] ROSA, A. M. L., CHAMPLIN, R. E., ET AL. Adenovirus infections in adult recipients of blood and marrow transplants. *Clinical Infectious Diseases* 32 (2001), 871–876.
- [80] RUBIN, R. H., SCHAFFNER, A., AND SPEICH, R. Introduction to the Immunocompromised Host Consensus Conference on Epidemiology, Diagnosis, and Management of Infections in Solid-Organ Transplant Patients. *Clinical Infectious Diseases* 33 (Suppl 1) (2001), (S1–4).
- [81] RUNDE, V., ROSS, S., ET AL. Adenoviral infection after allogeneic stem cell transplantation (SCT): Report on 130 patients from a single SCT unit involved in a prospective multi center surveillance study. *Bone Marrow Transplantation* 28 (2001), 51–57.

-
- [82] SALIMANS, M. M., HOLSAPPEL, S., ET AL. Rapid detection of human parvovirus b19 DNA by dot-hybridization and the polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* 23 (1989), 19–28.
- [83] SALMON, D., LACASSIN, F., HARZIC, M., ET AL. Predictive value of cytomegalovirus viremia for the occurrence of CMV organ involvement in AIDS. *Journal of Medical Virology* 32 (1990), (160–163).
- [84] SCHILHAM, M. W., CLAAS, E. C., VAN ZAANE, W., ET AL. High Levels of Adenovirus DNA in Serum Correlate with Fatal Outcome of Adenovirus Infection in Children after Allogenic Stem-Cell Transplantation. *Clinical Infectious Diseases* 35 (2002), (526–532).
- [85] SCHLEGEL, P. G. *Pädiatrie*, 1 ed. Christian Speer and Manfred Gahr, 2001, ch. 25, p. 736.
- [86] SCHLEUNING, M., JÄGER, G., ET AL. Human parvovirus b19-associated disease in bone marrow transplantation. *Infection* 27 (1999), 114–117.
- [87] SCHMIDT, G. M., HORAK, D. A., ET AL. A randomized, controlled trial of prophylactic ganciclovir for cytomegalovirus pulmonary infection in recipients of allogenic bone marrow transplants. *New England Journal of Medicine* 324 (1991), 1005–1011.
- [88] SEIDEMANN, K., HEIM, A., ET AL. Monitoring of adenovirus infection in pediatric transplant recipients by quantitative PCR: Report of six cases and review of the literature. *American Journal of Transplantation* 4 (2004), 2102–2108.
- [89] SEROPIAN, S., FERGUSON, D., ET AL. Lack of reactivity to CMV pp65 antigenemia test in a patient with CMV disease following allogenic bone marrow transplant. *Bone Marrow Transplantation* 22 (1998), 507–509.
- [90] SHIELDS, A. F., HACKMAN, R. C., FIFE, K. H., ET AL. Adenovirus infections in patients undergoing bone-marrow transplantation. *New England Journal of Medicine* 312, 9 (1985), (529–533).
- [91] SINGH-NAZ, N., BROWN, M., ET AL. Nosocomial adenovirus infection: Molecular epidemiology of an outbreak. *Pediatric Infectious Disease Journal* 12 (1993), 922–925.
- [92] SISSONS, J. G. P., BAIN, M., WILLS, M. R., ET AL. Latency and Reactivation of Human Cytomegalovirus. *Journal of Infection* 44 (2002), (73–77).
- [93] SISSONS, J. G. P., AND CARMICHAEL, A. J. Clinical Aspects and Management of Cytomegalovirus Infection. *Journal of Infection* 44 (2002), (78–83).
- [94] SLATKO, B. E. Thermal cycle dideoxy DNA sequencing. *Molecular Biotechnology* 6, 3 (1996), 311–22.

-
- [95] SÖDERBERG-NAUCLÉR, C., AND NELSON, J. A. Human Cytomegalovirus Latency and Reactivation - A Delicate Balance between the Virus and Its Host's Immune System. *Intervirology* 42 (1999), (314–321).
- [96] SÖDERLUND, M., ESSEN, R. V., ET AL. Persistence of parvovirus b19 DNA in synovial membranes of young patients with and without chronic arthropathy. *Lancet* 349 (1997), 1063–1065.
- [97] SÖDERLUND, M., RUUTU, P., ET AL. Primary and secondary infections by human parvovirus b19 following bone marrow transplantation: Characterization by PCR and b-cell molecular immunology. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 29(2) (1997), 129–135.
- [98] TANABE, K., TOKUMOTO, T., ET AL. Comparative study of cytomegalovirus (CMV) antigenemia assay, polymerase chain reaction, serology and shell vial assay in the early diagnosis and monitoring of CMV infection after renal transplantation. *Transplantation* 64 (1997), 1721–1725.
- [99] TONG, C. Y. W., CUEVAS, L. E., WILLIAMS, H., AND BAKRAN, A. Comparison of Two Commercial Methods for Measurement of Cytomegalovirus Load in Blood Samples after Renal Transplantation. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 3 (March 2000), (1209–1213).
- [100] TSUJIMURA, M., MATSUSHITA, K., SHIRAKI, H., ET AL. Human parvovirus B19 infection in blood donors. *Vox Sanguinis* 69 (1995), (206–212).
- [101] VAN DER BIJ, W., AND SPEICH, R. Management of Cytomegalovirus Infection and Disease after Solid-Organ Transplantation. *Clinical Infectious Diseases* 33 (Suppl 1) (2001), (S33–37).
- [102] VENARD, V., CARRET, A., ET AL. Genotyping of adenoviruses isolated in an outbreak in a bone marrow transplant unit shows that diverse strains are involved. *Journal of Hospital Infection* 44, 1 (January 2000), (71–74).
- [103] VERDONCK, L. F., DEKKER, A. W., ET AL. A risk-adapted approach with a short course of ganciclovir to prevent cytomegalovirus (CMV) pneumonia in CMV-seropositive recipients of allogeneic bone marrow transplants. *Clinical Infectious Diseases* 24 (1997), 901–907.
- [104] WALDELL, G. Molecular epidemiology of human adenoviruses. *Current Topics of Microbiological Immunology* 110 (1984), 191–220.
- [105] WALTER, E. A., AND BOWDEN, R. A. Infection in bone marrow transplant recipient. *Infectious Disease Clinics of North America* 9 (1995), 823–847.
- [106] WASSERMAN, R., AUGUST, C. S., AND PLOTKIN, S. A. Viral infections in pediatric bone marrow transplant patients. *Pediatric Infectious Disease Journal* 7, 2 (February 1988), (109–115).

- [107] WEINBERG, A., HODGES, T. N., ET AL. Comparison of PCR, antigenemia assay, and rapid blood culture for detection and prevention of cytomegalovirus disease after lung transplantation. *Journal of Clinical Microbiology* 38 (2000), 768–772.
- [108] YAEGASHI, N., NIINUMA, T., CHISAKA, H., ET AL. The incidence of, and factors leading to, parvovirus B19-related hydrops fetalis following maternal infection; report of 10 cases and meta-analysis. *Journal of Infection* 37 (1998), (28–35).
- [109] YOUNG, N. S., AND BROWN, K. E. Parvovirus b19. *New England Journal of Medicine* 350 (2004), 586–97.
- [110] ZAHRADNIK, J. M., SPENCER, M. J., AND PORTER, D. D. Adenovirus infection in the immunocompromised patient. *American Journal of Medicine* 68 (1980), (725–732).
- [111] ZAIA, J. A., SCHMIDT, G. M., ET AL. Preemptive ganciclovir based solely on asymptomatic pulmonary cytomegalovirus infection in allogenic bone marrow transplant recipients. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 1 (1995), 88–93.
- [112] ZAIA, J. A., SISSONS, J. G. P., ET AL. Status of cytomegalovirus prevention and treatment in 2000. *Hematology* (2000), 339–355.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, 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, persönlichen 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:

PD Dr. med. A. Sauerbrei, Prof. Dr. med. A. Stelzner, Frau Dr. R. Egerer, PD Dr. habil. A. Henke, PD Dr. habil. R. Zell, Dr. E. Birch-Hirschfeld, Prof. Dr. med. P. Wutzler,

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.

Erfurt, der 29. 12. 2005

Oliver Scheck

Lebenslauf

Name Oliver Scheck
Geburtstag 17. Mai 1977
Geburtsort Karlsruhe
Familienstand verheiratet, 2 Kinder

Schulbildung:

1983-1987 Grund- und Hauptschule Grünwinkel, Karlsruhe
1987-1996 Helmholtzgymnasium, Karlsruhe, Abschluss mit Abitur

Zivildienst:

1996-1997 Zivildienst im Städtischen Klinikum Karlsruhe

Universitätsstudium:

1997-2003 Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Abschluss mit dem 3. Staatsexamen

Berufliche Tätigkeit:

seit 2005 Ausbildungsassistent für Kinder- und Jugendmedizin in den Ilm-Kreis-Kliniken Arnstadt-Ilmenau gGmbH, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin Arnstadt

Erfurt, den

Oliver Scheck

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Axel Stelzner für die freundliche Überlassung des Themas und das Interesse an Fortgang und Abschluss der Arbeit. Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Andreas Sauerbrei für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit, sowie Herrn Prof. Dr. Peter Wutzler als amtierenden Leiter des Institutes für Virologie und Antivirale Therapie der Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Für die wissenschaftliche Betreuung über den gesamten Zeitraum dieser Arbeit möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Dr. Renate Egerer bedanken.

Weiterer Dank gilt Herrn PD Dr. habil. Andreas Henke für die Unterstützung und fachliche Beratung bei der Plasmidherstellung, Herrn PD Dr. habil. Roland Zell und insbesondere Herrn Dr. med. Andi Krumbholz für die Unterstützung bei der Sequenzierung und Herrn Dr. Eckard Birch-Hirschfeld für die Herstellung der Primer und Sonden, die wertvollen Tipps und Ratschläge.

Für die Einführung in molekularbiologischen Arbeitstechniken und die technische Unterstützung bei den praktischen Arbeiten möchte ich mich ganz herzlich bei Frau MTA Martina Müller bedanken. Weiterer Dank gilt auch Frau MTA Ohme, Frau MTA Angelike, Frau MTA Sabine Wachsmuth.

Ich möchte mich außerdem beim gesamten Team des Institutes für Virologie und Antivirale Therapie für die freundliche Aufnahme in das Team und die kollegiale Zusammenarbeit bedanken.

Abschließend gilt mein besonderer Dank meiner ganzen Familie. Vor allem meinen Eltern Elisabeth und Peter Scheck möchte ich für die finanzielle Unterstützung aber besonders für ihr Vertrauen, ihre aufbauenden Worte und ihre permanente Hilfe bedanken, ohne die ein Medizinstudium und die Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Auch meinen Schwiegereltern PD Dr. med. Klaus Mohnike und Dr. med. Dorita Mohnike danke ich für die moralische Unterstützung und Hilfe.

Ich möchte diese Arbeit meiner Frau Dorothea und meinem Sohn Niklas widmen, ohne deren Verständnis, aufbauende Worte, andauernde Unterstützung, Vertrauen und Liebe diese Arbeit nicht vollendet worden wäre.