

Entwicklung und Evaluierung von HCMV- und HHV6-Fusionsantigenen für den Einsatz im Mikroblootssystem

Dissertationsschrift

Zur Erlangung eines doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)
der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus
der Technischen Universität Dresden

vorgelegt von
Andrea Thäder-Voigt
aus Dresden

Dresden 2009

Gutachter: 1. Prof. Dr. Enno Jacobs
 2. Prof. Dr. Michael Bachmann

Vorsitzender der Promotionskommission:

 Prof. Dr. Henning Morawietz

Tag der mündlichen Prüfung: 14.06.2010

Tag der Verteidigung: 15.06.2010

Die Arbeit ist meinem verstorbenen Mann Tilo Thäder gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	8
1.1 Humane Herpesviren.....	8
1.1.1 Die humanen Betaherpesviren.....	9
1.2 Nachweis der HCMV- und HHV6-Viren.....	11
1.2.1 Nachweis der HCMV- und HHV6-Viren mittels Virusanzucht	12
1.2.2 Nachweis der HCMV- und HHV6-Viren durch molekularbiologische Methoden ..	12
1.2.3 Nachweis der HCMV- und HHV6-Viren durch serologische Methoden.....	13
1.3 Multiparameterdiagnostik.....	14
1.4 B-Lymphozyten, die Produzenten der Antikörper.....	14
1.4.1 Bildung und Reifung von B-Lymphozyten	14
1.4.2 B-Zellaktivierung und Antikörperproduktion.....	15
1.4.3 Aufbau und Funktion des Immunglobulins G.....	16
1.5 Hämatopoetische Stammzelltransplantation	17
1.5.1 Rekonstitution der B-Lymphozyten nach hämatopoetischer Stammzell- transplantation (HSZT)	18
1.5.2 HCMV und HHV6, ein pathogenes Potential nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSZT)	19
1.6 Zielstellung	21
2. Material und Methoden.....	22
2.1 Material.....	22
2.1.1 Geräte.....	22
2.1.2 Chemikalien und Substanzen	22
2.1.3 Medien.....	24
2.1.4 Zelllinie	24
2.1.5 Bakterien- und Virusstämme.....	24
2.1.6 Plasmide.....	25
2.1.7 Enzyme.....	25
2.1.8 DNA-Marker und Proteinmarker.....	25
2.1.9 Kits	25
2.1.10 Primer	26
2.2 Methoden	29
2.2.1 Expression der HCMV- und HHV6-Antigene.....	29
2.2.2 Evaluierung der viralen Antigene im Mikrobrot	49
2.2.3 Vergleichsanalysen.....	50
2.3 Patientenproben	52

2.4 Statistische Methoden	52
3. Ergebnisse	53
3.1 Expression der HCMV- und HHV6-Antigene.....	53
3.1.1 Auswahl der Zielsequenzen	53
3.1.2 Klonierung der Zielsequenzen in den Expressionsvektor pet 28a (+).....	54
3.1.3 Aufreinigung der Fusionsantigene.....	57
3.2 Evaluierung der Virusantigene im Mikroblot.....	59
3.2.1 Auswertung der Mikroblotdaten	62
3.2.2 Optimierung der Reaktionsbedingungen im Mikroblot.....	67
3.2.3 Plasma- und Liquordiagnostik – ein weiteres Einsatzfeld der Mikroblots.....	68
3.2.4 Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit der Messergebnisse im Mikroblot.....	77
3.2.5 Sensitivitäts- und Spezifitätstestung des HCMV-Mikroblots	82
3.2.6 Sensitivitäts- und Spezifitätstestung des HHV6-Mikroblots	85
3.2.7 Beurteilung der Testseren mit dem HHV6-IgG-Mikroblot	89
3.2.8 Untersuchungen zur serologischen Unterscheidung der HHV6-positiven Seren .	93
3.3 Antikörperkinetiken nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation.....	97
3.3.1 Entwicklung der HCMV spezifischen IgG-Antikörperantwort nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSZT).....	97
3.3.2 Entwicklung der HHV6 spezifischen IgG-Antikörperantwort nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSZT).....	100
4. Diskussion.....	104
4.1 Probleme der heterologen Proteinexpression	104
4.2 Grenzen der Aufreinigung über die Ni-NTA-Agarose-Säule.....	104
4.3 Semiquantitative Auswertung der Mikroblotdaten	105
4.4 Optimierung der Farbreaktion im Mikroblot.....	106
4.5 Seren, Plasmen und Liquores - im Mikroblot einsetzbare Probenmaterialien.....	107
4.5.1 Vergleich der Reaktivität von Seren und Plasmen im Mikroblot	107
4.5.2 Liquordiagnostik – Möglichkeiten und Grenzen mit dem Mikroblot.....	108
4.6 Untersuchungen zur Stabilität der Mikroblots.....	109
4.6.1 Reproduzierbarkeit der Messergebnisse in einem Reaktionsansatz	109
4.6.2 Signifikante Unterschiede bei wiederholter Messung an verschiedenen Tagen .	110
4.7 HCMV-Mikroblot - ein sensitives diagnostisches Testsystem.....	111
4.8 Drei verschiedene HHV6-Testsysteme – drei verschiedene HHV6-Prävalenzen	112
4.9 Der Mikroblot – eine serologische Methode zur Unterscheidung von monovalenten HHV6 A- und HHV6 B-Seren.....	114
4.9.1 Serologische Dominanz des HHV6 B-Subtyps.....	115

4.9.2 Interpretation der IgG-Antikörperreaktionen mit den homologen HHV6-Antigenpaaren	116
4.10 Unterschiedliche HCMV- bzw. HHV6-IgG-Antikörperkinetiken nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSZT).....	118
4.11 Reduktion der HCMV-Reaktivierung durch HCMV-positive Transplantatspender ...	121
4.12 HCMV pp52-F1 Antigen-spezifische IgG-Antikörperreaktionen – möglicherweise ein Nachweis für HCMV-Reaktivierungen nach HSZT	122
4.13 Wechsel der Antigen-spezifischen IgG-Antikörpermuster 182, 204 und 283 Tage nach der HSZT	123
4.14 Differenzierung der HHV6 A-Antigen- und HHV6 B-Antigen-spezifischen Antikörperreaktionen nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSZT).....	123
5. Zusammenfassung, Ausblick und Perspektiven für die Mikrobロットechnologie.....	125
6. Literatur	129
7. Danksagung:	142
8. Thesen	144

Abkürzungsverzeichnis:

CD 4+	cluster of differentiation 4, Rezeptor, Glykoprotein
CPE	zytotoxischer Effekt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Ebstein-Barr-Virus, humanes Herpesvirus 4
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
G-CSF	Granulozyten-Kolonien-stimulierender Faktor
GvHD	Graft-Versus-Erkrankung (Graft-Versus-Disease)
HCMV	humanes Zytomegalovirus
HHV6	humanes Herpesvirus 6
HHV7	humanes Herpesvirus 7
HHV8	humanes Herpesvirus 8
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HSV 1	humanes Herpesvirus 1, Herpes-Simplex-Virus
HSV 2	humanes Herpesvirus 2
HSZT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
IFT	Immunfluoreszenztest
Ig	Immunglobulin
IL12	Interleukin 12
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Jurkat	lymphoblastische T-Zelle
LCMV	lymphozytäre Choriomeningitis Virus
MEM	minimum essential Medium
Molt-3	periphere Blutzelle, lymphoblastische T-Zelle
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MRC5-Zellen	humane Lungenfibroblasten
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen
PCR	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
pp65	Phosphorprotein 65
PSZT	periphere Blutstammzelltransplantation
Qalb	Quotient aus Albumin Liquor/ Albumin Serum
QIgG	Quotient aus IgG Liquor/ IgG Serum
RT-PCR	Real time-polymerase chain reaction
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sup-T1	lymphoblastische T-Zelle
UV-Strahlung	ultraviolette Strahlung
VZV	humanes Herpesvirus 3, Varizella-Zoster-Virus

1. Einleitung

1.1 Humane Herpesviren

Die Durchseuchung der Bevölkerung in Deutschland mit den humanen Herpesviren liegt zwischen 40 und 90% und beginnt bereits im Säuglings- bzw. Kleinkindalter. Meist verlaufen Herpesinfektionen bei Immunkompetenten komplikationsfrei. Bei immunsupprimierten Transplantationspatienten oder HIV-infizierten Patienten hingegen können nach einer Primärinfektion oder Reaktivierung mit Herpesviren oft schwerwiegende Komplikationen wie Herpes stomatitis und Herpes enzephalitis auftreten. Humane Herpesviren (Herpesviridae) sind im Durchmesser ca. 180-200 nm groß und besitzen eine doppelsträngige DNA. Das ca. 120-240 kbp große Genom der Herpesviren wird von einem ikosaedrischen Kapsid geschützt, das von einer Lipiddoppelmembran umgeben ist. Zwischen der Lipidmembran und dem Kapsid befindet sich das Tegument. Die Tegumentproteine und die Glykoproteine der Lipidmembran stellen die Hauptantigene bei einer Immunantwort dar. Alle Herpesviren besitzen die Eigenschaft, neben der lytischen Replikation lebenslang im Wirt in latenter Form zu überdauern, wobei das DNA-Transkript episomal im Zellkern vorliegt. Während der Latenz werden keine infektiösen Viruspartikel produziert. Bei einer z.B. durch körperlichen Stress, Immunsuppression, UV-Strahlung oder durch andere Umwelteinflüsse verursachten Reaktivierung tritt das Virus erneut in den lytischen Infektionszyklus ein. Daher kommt es zur Produktion von infektiösen Viruspartikeln. Die Familie der humanen Herpesviridae untergliedert sich in 3 Unterfamilien. Man unterscheidet die Alphaherpesvirinae, die Betaherpesvirinae und Gammaherpesvirinae (Tabelle 1). Zu den Alphaherpesvirinae gehören das Humane Herpesvirus 1 (HSV 1) und 2 (HSV 2) sowie das Humane Herpesvirus 3 (VZV = Varizella Zoster Virus). Das Humane Herpesvirus 6 (HHV6) und das Humane Herpesvirus 5 (HCMV = Humane Cytomegalievirus) sowie das Humane Herpesvirus 7 (HHV7) gehören zu den Betaherpesvirinae. Das Humane Herpesvirus 4 (EBV = Epstein-Barr-Virus) und das Humane Herpesvirus 8 (HHV8) werden den Gammaherpesvirinae zugeschrieben.

Tabelle 1: Zusammenfassung der humanen Herpesviren

Unterfamilien der Herpesviridae	Spezies	Beispiele für Erkrankungen
<i>Alphaherpesvirinae</i>	Humanes Herpesvirus 1 Herpes-simplex-Virus	Herpes labialis, Herpes genitalis, Herpes keratitis
	Humanes Herpesvirus 2	Herpes genitalis, Herpes neonatorum
	Humanes Herpesvirus 3 Varizella-Zoster-Virus	Varizellen (Windpocken), Herpes zoster (Gürtelrose)
<i>Betaherpesvirinae</i>	Humanes Herpesvirus 5 Humanes Zytomegalovirus	Mononukleose ähnliche Erkrankung, Zytomegalie
	Humanes Herpesvirus 6	Drei-Tage-Fieber
	Humanes Herpesvirus 7	Drei-Tage-Fieber
<i>Gammaherpesvirinae</i>	Humanes Herpesvirus 4 Epstein-Barr-Virus	Mononukleose (Pfeiffer'sches Drüsenfieber), Burkitt-Lymphom
	Humanes Herpesvirus 8	Kaposi-Sarkom

1.1.1 Die humanen Betaherpesviren

1.1.1.1 Das humane Zytomegalievirus

Das humane Zytomegalievirus (HCMV) ist eines der wichtigsten Krankheitserreger bei immunsupprimierten Patienten, z.B. nach einer Organtransplantation [1, 2], Knochenmarktransplantation [3] bzw. hämatologischen Stammzelltransplantation [4, 5] oder bei HIV-Patienten [6, 7]. Außerdem spielt HCMV eine wichtige Rolle bei prä- oder perinatalen Infektionen [8]. Konnatale Infektionen mit HCMV können bei einer vorausgegangenen Infektion des Embryos z.B. zur Frühgeburt, Hörschäden, Entwicklungsdefekten, Hepatosplenomegalie, Thrombozytopenie bis hin zur Mikrozephalie führen. Die Übertragung von HCMV über Muttermilch ist die wichtigste Quelle für HCMV-Infektionen während der ersten Lebensjahre. Speichel, Blutkomponenten, Samen, Zervixsekret stellen weitere Infektionsquellen dar [9]. Auch die Übertragung von HCMV durch Stammzelltransplantation oder Organtransplantation ist beschrieben [10, 11]. Die Primärinfektion mit HCMV verläuft bei Immunkompetenten in der Regel asymptomatisch ab und ist serologisch durch den IgG-Titeranstieg nachweisbar. In einigen Fällen ähnelt das Krankheitsbild nach primärer HCMV-Infektion einer Mononukleose [12]. In Europa sind ca. 40-70% der erwachsenen Bevölkerung mit HCMV infiziert [9, 13]. Weltweit kann je nach Region die Durchseuchung bei nahezu 100% (Afrika und Asien) liegen [13]. HCMV infiziert bevorzugt Monozyten [14] oder die

CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen [15] des Knochenmarks und liegt latent in den Zellen vor. Während einer aktiven Infektion können viele Zelltypen, wie z.B. Endothelzellen, die Epithelzellen der Speicheldrüsen, Nierenepithelzellen und Parenchymzellen infiziert sein und entsprechende Krankheitsbilder verursachen. Bei immunsupprimierten Patienten kann sowohl die Primärinfektion, als auch die Reaktivierung zu verschiedenen Krankheiten, wie z.B. Pneumonie, Hepatitis, Colitis, Enzephalitis oder Retinitis führen [9].

1.1.1.2 Das Humane Herpesvirus 6

Die Primärinfektion mit dem humanen Herpesvirus 6 (HHV6) erfolgt im Kindesalter mit dem Abfall der passiven maternalen HHV6-Antikörper zwischen dem 3. und 24. Lebensmonat [16]. Bei einigen Kindern konnte die Primärinfektion mit HHV6 in den ersten drei Lebensmonaten gezeigt werden [17]. Die Primärinfektion kann entweder asymptomatisch ablaufen oder korreliert mit hohem Fieber bis zu 3 Tagen mit einem sichtbaren Exanthema subitum [18] (Dreitagefieber, Roseola infantum). Als Ursache für das Dreitagefieber wurde der HHV6 B-Subtyp beschrieben [19, 20]. Nur den HHV6 B-Subtypen konnte man auch im Speichel nachweisen, der als Hauptübertragungsquelle für HHV6-Infektionen bekannt ist [21-23]. Für das Humane Herpesvirus 6 sind zwei Subtypen bekannt: der bereits erwähnte HHV6 B- und der HHV6 A-Subtyp. Die Subtypen HHV6 A und HHV6 B weisen neben den Sequenzunterschieden (4%) Unterschiede in der Infektionsfähigkeit, im Replikationsmuster, in der Epidemiologie und der Pathogenität auf [24-27]. Beide Subtypen replizieren sich effizient in den CD4⁺ T-Lymphozyten [28, 29], Monozyten, Nabelschnurblutzellen und Vorläuferzellen des Knochenmarks, wodurch HHV6 Einfluss auf das Immunsystem nimmt [30]. Nur HHV6 A kann neben den CD4⁺ T-Lymphozyten auch effizient CD8 positive T-Lymphozyten infizieren [29]. Da HHV6 A häufig im Liquor nachweisbar ist und im Vergleich zu HHV6 B Oligodendrozyten effizienter infizieren kann sowie in Oligodendrozyten latent vorliegt, wird es daher als neurotrop beschrieben [26, 31]. Drobyski et al. (1994) konnten jedoch zeigen, dass auch der HHV6 B-Subtyp Ursache für neurologische Erkrankungen, wie die Enzephalitis sein kann [32]. Weiterhin wurde der HHV6 B-Subtyp als Ursache für das Drei-Tage-Fieber beschrieben. Da Fieberkrämpfe eine bekannte klinische Komplikation des Drei-Tage-Fiebers sind, ist somit eine Assoziation zwischen den HHV6 B-Infektionen und Fieberkrämpfen wahrscheinlich [17]. Demyelisierende Erkrankungen wie die Multiple Sklerose (MS) werden oft in Zusammenhang mit HHV6 diskutiert [33]. Das HHV6-Virus wurde aber auch schon als mögliche Ursache für Durchfall, Erbrechen, Husten und Hepatitis [17, 34] beschrieben. Die Durchseuchung mit HHV6 liegt in Deutschland im Erwachsenenalter bei über 90% [35]. Wie alle Herpesviren besitzt HHV6 die Fähigkeit zur Latenz. Man kann das HHV6-Virus in latenter Form in Monozyten [36], den Vorläuferzellen des Knochenmarkes [37] und in den Speicheldrüsen [19] finden. Außerdem konnte HHV6 in

integrierter Form in T-Zellen, Monozyten und Haarfollikeln nachgewiesen werden [38-40]. Obwohl Patienten mit integrierter HHV6-DNA keine klinischen Symptome zeigen, weisen sie im Blut oder Serum ungewöhnlich hohe Viruslasten bis zu mehreren Millionen von Kopien auf [40]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass in seltenen Fällen die HHV6-DNA integriert in humanen Chromosomen von den Eltern zu den Kindern über die Keimbahn vererbt werden kann [39, 41]. Kinder, die kongenital mit HHV6 infiziert sind, erscheinen nach der Geburt asymptomatisch. Neben der Vererbung des HHV6-Virus über die Keimbahn ist die Übertragung durch Nabelschnurblutzellen für beide HHV6-Subtypen als eine weitere Ursache für intrauterine Infektionen beschrieben worden [42, 43].

HHV6 kann wie das humane Zytomegalievirus über Blutstammzelltransplantate [44] und Organtransplantate [45] übertragen werden und bei Reaktivierung in Transplantationspatienten oder HIV-infizierten Patienten zu verschiedenen Krankheitsbildern wie z.B. Fieber, Hautausschlag, Pneumonie, Enzephalitis, Hepatitis und Knochenmarksdepression (Versagen der Implantation des Knochenmarktransplantats) führen [46, 47]. Eine Besonderheit ist, dass HHV6 in integrierter Form über die Blutstammzellen vom Spender zum Empfänger übertragen werden kann [48].

1.1.1.3 Das Humane Herpesvirus 7

Die HHV7-Primärinfektion erfolgt ca. ab dem 2. Lebensjahr und damit später als die HHV6-Infektionen [49, 50] und ist ebenfalls mit dem Exanthema subitum (Drei-Tage-Fieber) assoziiert [51]. Enzephalitiden und Fieberkrämpfe während der Primärinfektion wurden auch für HHV7 beschrieben [49, 52, 53]. Wie HHV6 infiziert das HHV7-Virus CD4⁺ T-Lymphozyten und liegt latent in diesen Zellen vor. HHV7 kann sich aber auch in CD34⁺ pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen vermehren und nimmt Einfluss auf das Überleben und die Differenzierung dieser Zellen [54]. Weiterhin konnte HHV7 auch aus Speicheldrüsen isoliert werden, die damit als Infektionsquellen dienen [55]. Kongenitale Infektionen, wie für HHV6 wurden für HHV7 nicht beschrieben [43, 56]. Jedoch konnte HHV7 in der Muttermilch nachgewiesen werden [57]. Im Erwachsenenalter liegt die HHV7-Seroprävalenz in Europa und in den USA zwischen 75 und 90% [58].

1.2 Nachweis der HCMV- und HHV6-Viren

Der Nachweis der HCMV- sowie HHV6-Viren kann direkt und indirekt erfolgen. Für den direkten Nachweis werden die Viren auf Zellkultur angezüchtet und können anhand der Erscheinungsbilder in der Zellkultur sowie durch Virusantigene oder die Virus-DNA oder -RNA nachgewiesen werden. Der Nachweis von virusspezifischen Antikörpern mit Hilfe der serologischen Testsysteme wird dagegen als indirekte Nachweismethode bezeichnet.

1.2.1 Nachweis der HCMV- und HHV6-Viren mittels Virusanzucht

Der direkte Nachweis von Herpesviren aus Probenmaterial kann durch die Anzucht der Viren auf Zellkultur und den anschließenden Nachweis des Virus erfolgen. Die Vermehrungszeit des Virus bis zum zytopathischen Effekt (CPE) und das Erscheinungsbild der Zellen können Hinweise auf das gesuchte Virus geben. Der Virustyp wird anschließend über z.B. immunzytochemische Antikörpernachweise oder DNA-Hybridisierungstechnologien sowie durch PCR-Methoden nachgewiesen.

Das HCMV-Virus ist sehr gut auf primären humanen Fibroblasten kultivierbar. Ca. 2-3 Wochen nach der Infektion mit dem HCMV-Virus wird ein zytopathischer Effekt (CPE) sichtbar. Typisch für eine HCMV-Infektion sind die vergrößerten Zellen (Cytomegalie) mit den Einschlusskörperchen.

Das HHV6-Virus lässt sich in der Regel auf CD4⁺ T-Zellen oder auf mit Interleukin 12 (IL12) und Phytohaemagglutinin (PHA) stimulierten mononuklearen Zellen kultivieren [18]. Ca. 3-8 Tage nach der Infektion ist der zytopatische Effekt mit dem Auftreten von Synzytien nachweisbar. Weiterhin kann das HHV6-Virus effizient auch auf Sup-T1-Zellen kultiviert werden [59].

1.2.2 Nachweis der HCMV- und HHV6-Viren durch molekularbiologische Methoden

1.2.2.1 Möglichkeiten und Grenzen der Polymerasekettenreaktion (PCR)

In den meisten diagnostischen Laboratorien ist der Nachweis der HCMV- bzw. HHV6-Virämie mittels qualitativer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) oder quantitativer Real-Time PCR (RT-PCR) etabliert. Multiplex PCRs oder multiplex RT-PCRs zur simultanen Unterscheidung von HHV6 A- und HHV6 B-Virämien wurden beschrieben [60, 61]. Mit spezifischen Primern wird mittels PCR die Virus-DNA im Blutplasma nachgewiesen. Der Nachweis der Virus-DNA im zellfreien Plasma korreliert mit einer aktiven Replikation [62] und dient in den Laboratorien als Indikator für eine Herpesreplikation. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die nachgewiesene Virus-DNA von lysierten Zellen stammt [63] und damit keinen Marker für eine aktive Virusreplikation darstellt [64]. Da die humanen Betaherpesviren latent in peripheren Blutstammzellen vorliegen und die nachgewiesene Virus-DNA aus den lysierten Zellen stammen kann, ist die Verwendung von Vollblut als Probenmaterial als fragliches Material zur Beantwortung einer eventuellen Replikation anzusehen [3, 64]. Außerdem können Patienten mit integrierter HHV6-DNA hohe Viruslasten aufweisen, obwohl sie keine aktive Replikation zeigen. Diese Probleme stellen den Diagnostiker vor eine schwierige Aufgabe. Er muss entscheiden, ob es sich bei der positiven PCR aus Plasma oder Vollblut um eine aktive Betaherpesinfektion handelt oder nicht.

1.2.2.2 Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Norton et al. zeigten, dass man mit der Reverse Transkriptase PCR zwischen latenter und aktiver humaner Herpesvirusinfektion 6 unterscheiden kann [65]. Bei einer lytischen Virusreplikation wird mRNA transkribiert, die mittels der RT-PCR als Marker für eine aktive Infektion oder Reaktivierung nachgewiesen werden kann. Jedoch wiesen Boutolleau et al. (2006) darauf hin, dass eine Charakterisierung der viralen Genexpression bei Personen mit integrierter HHV6-Sequenz notwendig ist [66]. Sie zeigten in Experimenten, dass bei gesunden Personen mit integrierter HHV6-DNA trotz fehlender klinischer Zeichen für eine HHV6-Reaktivierung in allen 12 Fällen Transkripte nachzuweisen waren.

1.2.3 Nachweis der HCMV- und HHV6-Viren durch serologische Methoden

1.2.3.1 pp65-Antigennachweis

Eine in der Diagnostik oft verwendete Methode zum Nachweis einer aktiven Zytomegalieerkrankung ist der Nachweis des pp65-Antigens im Zellkern der Blutleukozyten. Das pp65-Protein ist ein Tegumentprotein und gehört zu den „frühen“ Proteinen, die als Transaktivatoren für die „späten“ Gene wirken. Das pp65-Protein korreliert mit dem Auftreten der Erkrankungen, die durch das HCMV-Virus verursacht werden und ist daher ein wichtiger Marker für die HCMV-Infektion. Der pp65 Antigen-Test ist eine auf der Immunperoxidasefärbung basierende Nachweismethode. Positiv gefärbte Zellen werden im Lichtmikroskop gezählt.

1.2.3.2 ELISA und IFT

Der serologische Nachweis von HCMV und HHV6 ist in vielen diagnostischen Laboratorien etabliert. Der indirekte Immunfluoreszenztest (IFT) und der Enzymgekoppelte Immunadsorptionstest (ELISA) sind die Standardtests zum Nachweis von HCMV oder HHV6. Bei einer Primärinfektion kann man serologisch eine IgM-Antwort gefolgt von einem IgG-Titeranstieg nachweisen. Bei der Bestimmung des IgM-Titers treten jedoch Kreuzreaktionen [67] sowie falsch positive oder falsch negative Ergebnisse auf [19]. Der IgM-Titer reicht daher als alleinige Aussage für die Diagnose einer akuten Infektion nicht aus. Bei einer Superinfektion mit einem anderen Stamm des gleichen Virus oder der Reaktivierung des Virus fehlt oft eine IgM-Antwort. Man kann dann nur auf Grund des IgG-Titeranstieges auf eine Reaktivierung schließen. Bei fehlender Immunkompetenz bleibt der Anstieg des IgG-Titers jedoch oft aus. Kommerzielle Western Blots für den Nachweis „late antigens“ von HCMV sind zwar verfügbar, werden aber nur in Speziallaboratorien eingesetzt. Serologische

ELISA-Tests auf der Basis von Mischantigenen für HCMV oder HHV6 zeigen bei immunsupprimierten Patienten meist alte Infektionen an.

Bei HHV6 gibt es zwei Subtypen, HHV6 A und HHV6 B. Eine serologische Unterscheidung von HHV6 A und HHV6 B ist oft wünschenswert, allerdings ist dies mit den derzeit in Laboratorien verwendeten serologischen Testsystemen nicht möglich [56]. Weiterhin konnte man bei den in diagnostischen Laboren vorhandenen serologischen Testsystemen trotz vom Hersteller angegebenen unterschiedlich verwendeten Subtypspezifischen Antigenen, wie z. B. dem HHV6-IFT und HHV6-ELISA Kreuzreaktionen beobachten.

1.3 Multiparameterdiagnostik

Unter der Multiparameterdiagnostik versteht man die gleichzeitige Bestimmung mehrerer Messparameter in einer Probe. Für die Multiparameterdiagnostik geeignet sind der ELISA, welcher eine parallele Abarbeitung der Probe in getrennten Kavitäten erlaubt, verschiedene Varianten der Blotmethoden wie Western Blot, Streifenblot oder der hier vorgestellte Mikroblot sowie die Protein-Biochips (Microarray) und die Protein-Beadarrays (z.B. das Luminex-System).

Der Mikroblot ist prinzipiell ein miniaturisierter Streifentest (6mm x 2mm), der in die Kavitäten von Standard 96 Well-Mikrotestplatten integriert wurde. Bis zu 10 Antigene können im Mikroblot mit einer Bestimmung getestet werden.

1.4 B-Lymphozyten, die Produzenten der Antikörper

Die B-Lymphozyten sind die Hauptakteure der humoralen Immunantwort. Sie haben als einzige Lymphozyten die Fähigkeit, Antikörper zu produzieren, Krankheitserreger zu neutralisieren und zu opsonieren sowie die Komplementaktivierung zu induzieren. Der Nachweis von Antikörpern mit serologischen Testsystemen dient als indirektes Indiz von Krankheitserregern wie z.B. Viren oder Bakterien.

1.4.1 Bildung und Reifung von B-Lymphozyten

Die B-Zell-Entwicklung wird in zwei anatomisch getrennte Entwicklungsphasen untergliedert. Die erste Phase läuft bei Erwachsenen im Knochenmark ab und beinhaltet die Entwicklung der Vorläuferzelle. Die zweite Phase umfasst die durch Antigene regulierte B-Zellreifung in den sekundären lymphatischen Organen. Die pluripotenten hämatopoetischen CD34⁺ Stammzellen binden sich über Adhäsionsmoleküle an die Stromazellen des Knochenmarks. Dort läuft die Entwicklung der B-Lymphozyten über mehrere Entwicklungsstadien, die von den Stromazellen sekretierten zeitabhängigen und konzentrationsabhängigen Wachstums-

bzw. Differenzierungsfaktoren sowie Komponenten der extrazellulären Matrix (membrangebundene Liganden, Adhäsionsmoleküle) gesteuert werden. Das erste Stadium nach der hämatopoetischen Stammzelle ist die Pro-B-Zelle. In diesem Stadium werden noch keine Antikörper exprimiert. Durch Rekombinationsprozesse werden die Gene der schweren Immunglobulinketten neu arrangiert (DNA-Rearrangement), so dass funktionelle schwere Immunglobulinketten gebildet werden. Die Bildung funktioneller schwerer Immunglobulinketten stellt das Stadium der Prä-B-Zelle dar. In den kleinen Prä-B-Zellen, die durch die Teilung der großen Prä-B-Zellen entstehen, beginnt das DNA-Rearrangement der leichten Ketten. Bei erfolgreichem Rearrangement der leichten Ketten werden komplette B-Zell-Rezeptormoleküle IgM auf der Zelloberfläche exprimiert. Zellen mit kompletten IgM-Rezeptormolekülen werden als unreife B-Zellen bezeichnet. Nach Prüfung der B-Rezeptormoleküle auf „zentrale Selbsttoleranz“ (Autotoleranz) verlassen die B-Lymphozyten das Knochenmark und reifen in den peripheren Lymphorganen weiter. Dort findet die Prüfung der B-Zellrezeptormoleküle auf sogenannte „periphere Selbsttoleranz“ statt. Der Kontakt mit den folliculären dendritischen Zellen in den Primärfollikeln der sekundären Lymphorgane ist für das Überleben der naiven B-Lymphozyten notwendig und stellt einen weiteren Selektionsschritt dar. Die nun reifen B-Lymphozyten exprimieren IgM-Rezeptoren und IgD-Rezeptoren auf der Zelloberfläche.

1.4.2 B-Zellaktivierung und Antikörperproduktion

In den sekundären lymphatischen Organen erfolgt die weitere B-Zellreifung, die durch Antigene reguliert ist. Die naiven B-Lymphozyten zirkulieren im Blut und wandern, gelenkt von Chemokinen über postkapilläre Venolen in die Primärfollikel der Lymphknoten ein. In den Primärfollikeln werden Antigene auf der Oberfläche der folliculären dendritischen Zellen über Fc-Rezeptoren oder Komplement-Rezeptoren den B-Lymphozyten präsentiert. B-Zell-Rezeptoren sind in der Lage, eine große Variation an molekularen Strukturen wie Proteine, Glykoproteine und Polysaccharide zu erkennen. Die Bindung der Antigene an den Rezeptor erzeugt ein Aktivierungssignal, wodurch es zur Wanderung der B-Lymphozyten in Richtung des T-Zell-Areals kommt (Parakortikale Areal). Ebenfalls durch Antigene aktivierte T-Zellen wandern in Richtung Primärfollikel (B-Zell-Areal). Die erneute Aktivierung der B-Lymphozyten erfolgt durch die aktivierten CD4⁺T-Lymphozyten an der Grenze zwischen B-Zell- und T-Zell-Areal über den CD40-Rezeptor (T-zellabhängige B-Lymphozytenaktivierung). Die CD4⁺T-Lymphozyten produzieren Zytokine, wie IL-4 oder IFN- γ , die die Proliferation, die klonale Expansion der B-Lymphozyten und den Isotyp-Wechsel der B-Zellrezeptoren induzieren. Ein Teil der aktivierten B-Lymphozyten wandert in die Primärfollikel zurück und bildet durch klonale Expansion Keimzentren aus, wo die Affinitätsreifung und der Isotyp-Wechsel der B-Zellrezeptoren stattfinden. Die Differenzierung

in Antikörper sezernierende B-Plasmazellen wird durch die Zytokine IL-5 und IL-6 stimuliert. Die Plasmazellen wandern über Lymphgefäße und das Blutssystem ins Knochenmark oder in die Milz, wo die Bildung der löslichen Antikörper stattfindet. Langlebige Plasmazellen können über eine lange Zeit im Knochenmark oder in der Milz überleben und spezifische Antikörper produzieren. Manz et al. (1997) zeigten, dass langlebige Plasmazellen ohne sich zu teilen im Knochenmark bis zu 3-4 Monate überleben und konstant Antikörper produzieren [68]. Das Überleben der langlebigen, konstant Antikörper produzierenden Plasmazellen ist von im Knochenmark oder der Milz befindlichen Zytokinen (IL6), Stromazellen und extrazellulären Matrixsignalen abhängig [69]. Vom Antigen selbst ist das Überleben und die Aktivität der langlebigen Plasmazellen unabhängig [70]. Antigene triggern die Bildung von neuen Plasmazellen. Diese können die alten langlebigen Plasmazellen im Knochenmark verdrängen. Slifka et al. (1998) konnten in Mäusen nach der Zerstörung der B-Gedächtniszellen durch Ganzkörperbestrahlung LCMV (lymphozytäre Choriomeningitis Virus) spezifische Antikörper produzierende Plasmazellen länger als ein 1 Jahr nachweisen [71]. Einige aktivierte B-Lymphozyten differenzieren sich nach der Affinitätsreifung in Gedächtnis-B-Zellen, die immer wieder in die Follikel einwandern und dort von den dendritischen Zellen präsentierte Antigene aktiviert werden können und weitere Plasmazellen bilden. Die meisten B-Gedächtniszellen wurden in der Marginalzone der Milz und im Epithelium der Peyer´s patches und dem Epithelium der Tonsillen nachgewiesen [72]. Einige B-Gedächtniszellen können aber auch über längere Zeit ohne Zellteilung persistieren [73]. Die langlebigen Plasmazellen und die B-Gedächtniszellen bilden als „Effektorgedächtniszellen“ und „zentrale Gedächtniszellen“ das B-Zell-Gedächtnis. Die sogenannten „zentralen Gedächtniszellen“ repräsentieren die Vorläufer-B-Gedächtniszellen, die in der Lage sind, neue Plasmazellen zu bilden.

1.4.3 Aufbau und Funktion des Immunglobulins G

Antikörper bzw. Immunglobuline sind Bestandteil der humoralen Immunantwort. Sie kommen in löslicher Form in den Lymphflüssigkeiten oder im Blut vor und werden von den B-Plasmazellen sezerniert. Antikörper können aber auch gebunden auf der Membranoberfläche der B-Lymphozyten vorliegen. Alle Antikörper sind aus Y-förmigen Molekülen aufgebaut. Jeder Antikörper ist aus zwei schweren H-Ketten (150kDa) und zwei leichten L-Ketten (25kDa) aufgebaut, die über Disulfidbrücken verbunden sind. Die Y-förmigen Moleküle besitzen eine variable Region (V-Region) und eine konstante Region (C-Region). Die variable V-Region bindet die Antigene. Die C-Region ist konstant und aktiviert durch die eigene Bindung die Effektorzellen. Im Menschen sind fünf verschiedene Antikörperisotypen bekannt, die auf Grund der C-Region unterschieden werden: das IgM, IgD, IgG, IgA und IgE. Immunglobulin G wird außerdem noch in verschiedene Subtypen (IgG

1 bis 4) unterteilt. Antikörper haben innerhalb der humoralen Immunantwort die Aufgabe, Krankheitserreger wie Bakterien, Viren oder Pilze zu neutralisieren, zu opsonieren oder eine Komplementaktivierung zu induzieren und somit eine Infektion der Zelle sowie die Ausbreitung des Erregers zu verhindern.

Antikörper erkennen einen kleinen Teil der molekularen Struktur eines Antigenmoleküls, welches als Epitop bezeichnet wird. Antikörper können lineare Epitope (Aminosäuresequenzen), Konformationsepitope (räumliche Struktur der Proteine) oder Zuckerstrukturen bzw. andere chemische Strukturen erkennen und binden nichtkovalent durch elektrostatische Kräfte, Wasserstoffbrückenbindung, van der Waals Kräfte oder hydrophobische Bindung an das Epitop bzw. Antigen. Die Antigenbindungsstelle des Antikörpers, die ein Epitop bindet, bezeichnet man als Paratop. Da die Immunglobuline G bivalent sind, besitzen sie zwei Antikörperbindestellen.

1.5 Hämatopoetische Stammzelltransplantation

Leukämien, Lymphome und multiple Myelome sind maligne hämatologische Erkrankungen, die durch krankhafte Zellen des Blutsystems verursacht werden. Leukämien werden in Abhängigkeit von betroffenen blutbildenden Zellen in die vier Hauptgruppen akute myeloische Leukämie, akute lymphatische Leukämie, chronische myeloische Leukämie und chronische lymphatische Leukämie untergliedert. Maligne Lymphome sind Krebserkrankungen des lymphatischen Systems, die durch veränderte Lymphozyten verursacht werden und eine Lymphknotenschwellung (Lymphadenopathie) verursachen. Sie werden in Hodgkin-Lymphom und Non-Hodgkin-Lymphom unterteilt. Multiple Myelome oder Plasmazytome sind durch die Proliferation von Plasmazellen im Knochenmark gekennzeichnet. Alle diese malignen Erkrankungen des blutbildenden Systems werden durch hämatopoetische Stammzelltransplantationen behandelt. Vor der Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen muss das maligne hämatopoetische System des erkrankten Patienten durch Chemotherapie und/ oder durch Ganzkörperbestrahlung zerstört werden. Anschließend wird das zerstörte Blutsystem durch die hämatopoetischen Stammzellen ersetzt. Die hämatopoetischen Stammzellen können je nach Erkrankung vom Patienten selbst oder einem Fremdspender stammen. Bei einer Eigenspende spricht man von autologer Stammzelltransplantation. Bei einer allogenen Stammzelltransplantation stammen die hämatopoetischen Stammzellen von einem Fremdspender. In den Kliniken werden heute anstatt der Knochenmarktransplantationen periphere Blutstammzelltransplantationen (PSZT) durchgeführt. Dem Stammzellspender wird zur Vermehrung der hämatopoetischen Stammzellen im Blut über 4-6 Tage der Granulozyten-Kolonien-stimulierende Faktor (G-CSF) - ein Wachstumsfaktor - verabreicht. Anschließend wird über eine Kanüle dem Stammzellspender Blut entnommen. Das Blut wird durch einen Zellseparator gepumpt, wo

mittels Dichtezentrifugation die Blutbestandteile aufgetrennt und die mononukleären Zellen gesammelt werden. Die restlichen Blutbestandteile erhält der Spender über eine weitere Kanüle zurück. Mittels Durchflusszytometrie werden in der gesammelten mononukleären Zellfraktion die CD34⁺-Zellen bestimmt. Für eine autologe Transplantation werden 2,5*10⁶/kg CD34⁺-Zellen benötigt. Ca. 1 bis 3 Wochen nach der Stammzellübertragung an den Empfänger erfolgt das „Engraftment“ oder so genannte „Homing“ der Stammzellen. Unter dem „Engraftment“ versteht man das Anwachsen der hämatopoetischen Stammzellen. Sichtbar wird dieser Zeitpunkt durch das Erscheinen von Monozyten und Neutrophilen im Blut. Die Granulozyten und Thrombozyten sollten einen Minimalwert von >0,5 GPT/l Granulozyten und >50 GPT/l Thrombozyten überschritten haben. Nach der Stammzelltransplantation kann es durch die T-Lymphozyten des Spenders zu einer Graft-versus-Host-Erkrankung kommen. Die T-Lymphozyten erkennen das Gewebe des Empfängers als fremd, greifen es an bzw. zerstören dieses.

1.5.1 Rekonstitution der B-Lymphozyten nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSZT)

Die Regenerierung der B-Lymphozyten nach einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation ist in erste Linie von der Qualität der Stammzellen und den im Stammzelltransplantat übertragenen B-Lymphozyten und T-Lymphozyten abhängig. Chemotherapie, Infektionserkrankungen, GVHD-Erkrankungen und die Medikamentierung nehmen ebenfalls einen Einfluss auf die Erholung der B-Lymphozyten nach einer Blutstammzelltransplantation. B-Lymphozyten sind in den ersten zwei Monaten nicht oder in einer nur sehr geringen Anzahl nachweisbar [74]. Ab dem 3. Monat erhöht sich die Anzahl der nachweisbaren B-Lymphozyten und erreicht ca. 9-12 Monate nach der hämatopoetischen Stammzelltransplantation die Normalzellzahl [74, 75]. Ein bis zwei Jahre nach der Blutstammzelltransplantation kann die Anzahl der B-Lymphozyten höher sein als bei gesunden Menschen. Bis zu 18 - 24 Monate nach der Transplantation dominiert jedoch der Anteil an naiven B-Lymphozyten. Erst nach 6 Monaten ist ein kleiner Anteil an CD27⁺IgD⁻ B-Lymphozyten, die einen Isotyp-Wechsel vollzogen haben, nachweisbar [75]. Die Anzahl der B-Gedächtniszellen hingegen bleibt bis zum 1. Jahr erniedrigt und liegt unter der Normalzellzahl. Das ist nicht verwunderlich, da die follikulären dendritischen Zellen, die wichtig für die Bildung des Keimzentrums sind und unterstützend beim Klassenwechsel sowie der somatischen Hypermutation der B-Lymphozyten wirken, ein Jahr nach der Transplantation immer noch erniedrigt sind [74]. Neben den Gedächtniszellen und den dendritischen Zellen spielen die CD4⁺T-Lymphozyten bei der Aktivierung der B-Lymphozyten und bei der humoralen Immunantwort eine wichtige Rolle. Die CD4⁺-T-Lymphozyten sind in den ersten drei Monaten (<200 Zellen/ µl) bis zu einem Jahr (ca. 300 Zellen/ µl) ebenfalls

deutlich erniedrigt und erreichen erst nach über 20 Jahren die Normalzellzahl [76, 77]. Die schnelle und kurzfristige Immunrekonstitution wird durch die im Stammzelltransplantat übertragenen T- und B-Lymphozyten ermöglicht. Aber auch chemoradioresistente Plasmazellen und T-Gedächtniszellen tragen zur frühen Immunrekonstitution der Patienten bei [78, 79]. Plasmazellen, die durch die Chemotherapie nicht zerstört wurden sowie die mit dem Stammzelltransplantat übertragenen B-Gedächtnis- und Plasmazellen bilden nach der hämatopoetischen Stammzelltransplantation einen Pool an Antikörper bildenden B-Lymphozyten [79, 80]. Die von chemoradioresistenten Plasmazellen gebildeten Antikörper sind bis zu einem Jahr nach der Blutstammzelltransplantation nachweisbar [78, 79]. Das Normallevel an Immunglobulin IgG ist ca. nach 3 - 8 Monaten erreicht [81]. Jedoch ist die Menge an vor einer Infektion schützenden Antikörpern gering, da das IgG häufig aus monoklonalen und oligoklonalen Immunglobulinen sowie Autoantikörpern gebildet wird, die jedoch kaum Schutz gegen Infektionen bieten [82].

1.5.2 HCMV und HHV6, ein pathogenes Potential nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSZT)

Auf Grund der therapiebedingten Immunsuppression sind in der frühen Phase nach der hämatopoetischen Stammzelltransplantation bakterielle, virale oder fungale Infektionen häufig und stellen ein tödliches Potenzial für die Patienten dar. Infektionen bzw. Reaktivierung der Betaherpesviren, wie z.B. das humane Zytomegalievirus und das humane Herpesvirus 6 sind nach einer Blutstammzelltransplantation sehr häufig und verursachen verschiedene Krankheiten, wie z.B. Pneumonien, Retinitis, Fieber, Enzephalitis und gastrointestinale Ulzera [3, 83, 84]. Außerdem werden oft das HCMV-Virus und das HHV6-Virus in Zusammenhang mit der Abstoßung des Stammzelltransplantates gebracht [83]. Alle Betaherpesviren (HCMV und HHV6) besitzen die Eigenschaft, CD34⁺ hämatopoetische Stammzellen zu infizieren und können in ihnen latent vorliegen [15, 37, 54, 85, 86]. Kontroverse Studien bezüglich des Zusammenhangs der HHV6-Reaktivierung und der Graft versus Erkrankung (GvHD) sowie des späten Anwachsens des Transplantats (Engraftment) wurden publiziert. In einigen Studien wurde die Graft versus Erkrankung und das späte Engraftment in Zusammenhang mit der HHV6-Reaktivierung gebracht. Andere Studien konnten diesen Zusammenhang nicht bestätigen. Die unterschiedlichen Ergebnisse können Ursache der verschiedenen Grunderkrankungen oder aber auch unterschiedlicher Therapien sein [87]. Um eindeutige Ergebnisse zu erhalten, müssten sowohl die Nachweismethoden (PCR, Serologie, Virusisolation) als auch die Patientendaten evaluiert werden. Der gleichzeitige Befall von HCMV und HHV6 nach einer Transplantation wurde ebenfalls beschrieben und stellt ein großes letales Risiko neben dem Auslösen einer bakteriellen Superinfektion dar. HHV6-Infektionen wurden als Kofaktor für die Entwicklung der HCMV-

Erkrankung nach der hämatopoetischen Stammzelltransplantation beschrieben [88, 89]. Der HCMV-Serostatus der Empfänger und Spender ist der entscheidende Risikofaktor einer HCMV-Infektion bzw. -Reaktivierung [90]. HCMV positive Transplantatempfänger weisen unabhängig vom Antikörperstatus des Donors eine höhere Mortalitätsrate als HCMV seronegative Transplantatempfänger auf, die das Stammzelltransplantat von einem HCMV-positiven Spender erhalten [91]. Das Risiko einer HCMV-Reaktivierung für HCMV positive Transplantatempfänger kann durch die Auswahl eines HCMV positiven Spenders reduziert werden, da mit dem Stammzelltransplantat gegen das HCMV-Virus aktivierte B- und T-Lymphozyten vom Spender übertragen werden [92].

Neben der durch HHV6 verursachten Reaktivierung von HCMV kann eine gesteigerte Produktion von Zytokinen während einer bakteriellen Infektion oder einer GvHD eine HCMV-Reaktivierung auslösen bzw. verstärken [3].

Nach einer Blutstammzelltransplantation können die Reaktivierungen von HCMV und HHV6 zu definierten Zeitintervallen nachgewiesen werden. Bereits 2 - 4 Wochen nach der Knochenmarktransplantation konnte bei 38% der Patienten und nach der peripheren Stammzelltransplantation bei 48% der Patienten eine HHV6-Reaktivierung nachgewiesen werden [46, 47, 93]. HCMV-Reaktivierungen hingegen treten ca. 33 - 135 Tage nach der Transplantation [94-97] und damit später als HHV6-Reaktivierungen auf.

1.6 Zielstellung

Das Ziel der Arbeit war die Entwicklung neuer serologischer Testverfahren zum Nachweis von IgG-Antikörpern gegen Antigene des humanen Zytomegalievirus und des humanen Herpesvirus 6 auf der Basis der Mikrobロットtechnik. Die Mikrobロットtechnologie - ein Multiparameterdiagnostiksystem - ist eine miniaturisierte Form der Streifenfestesttechnologie, die in Mikrowellplatten eingebracht werden und den simultanen Nachweis von bis zu zehn Antigen-spezifischen IgG-Antikörpern ermöglicht. Die neue Technik des Mikroblots wurde von der Firma Attomol GmbH (Schulweg 6, 03205 Lipten) patentiert. Im Rahmen des BMBF-Projektes BioResponse (Projektträger Jülich; Förderkennzahl beim BMBF: 03WKR03E) und der nachfolgenden Stipendiatenförderung durch die Jürgen-Manchot-Stiftung sollten in dieser Arbeit rekombinante Fusionsantigene von Proteinbereichen des humanen Zytomegalievirus und des humanen Herpesvirus 6 für den Einsatz im Mikrobロット entwickelt und evaluiert werden. Ein weiterer Fokus lag auf der serologischen Unterscheidung der Subtypen HHV6 A und HHV6 B mit Hilfe der Mikrobロットtechnologie. Weiterhin sollten durch die Beurteilung der Erwachsenen- und Kinderseren mit dem HHV6-IgG-Mikrobロット Unterschiede in der Verbreitung sowie in den Infektionsabläufen der HHV6-Subtypen aufgezeigt werden.

Ein weiteres Ziel der Arbeit bestand in der Untersuchung von HCMV- bzw. HHV6-IgG-Antikörperantworten von Patienten nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSZT) mittels Mikrobロットtechnologie im Rahmen einer klinischen Beobachtungsstudie. Anhand der IgG-Antikörperverläufe und der differenzierten Auswertung der IgG-Antikörperantworten sollte die Reaktivierung oder Superinfektion von β -Herpesviren nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation bei immunsuprimierten Patienten serologisch nachgewiesen werden. Weiterhin bestand die Absicht, mit der Mikrobロットtechnologie zu untersuchen, ob Antigen-spezifische IgG-Antikörperreaktionen der Transplantatempfänger auch nach der hämatopoetischen Stammzelltransplantation nachweisbar sind. Die Auswertung der Antigen-spezifischen IgG-Antikörperreaktionen nach der HSZT sollte außerdem Aufschluss über die Entwicklung der B-Lymphozytenpopulation der Empfänger geben. Untersuchungen mit dem HHV6-IgG-Mikrobロット zielten weiterhin darauf, mögliche zeitliche Unterschiede bei der Reaktivierung der HHV6-Subtypen nach der hämatopoetischen Stammzelltransplantation aufzuzeigen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät:	Firma
Avanti™ J-20	Beckman Coulter™
Biofuge-Zentrifuge	Heraeus
Vacuumzentrifuge RVC 2-18	CHRIST
Pipetten	Eppendorf
Mastercycler <i>gradient</i>	Eppendorf
Brutschrank	Heraeus instruments
DNA-Sequenzierer	ABI Prism 3100
Heizblock	Grant Q BD2
Thermomixer compact	Eppendorf
Bio Photometer	Eppendorf
Midi-Gelapparatur	Invitrogen
Semidry-Blotapparatur	Techne
Electrophoresis Power Supply-EPS601	Amersham Pharmacia biotech
Kippschüttler	Heidolph DUOMAX 1030
IKA-Schüttler MTS 2	IKA-Labortechnik

2.1.2 Chemikalien und Substanzen

Chemikalie	Firma
Natriumchlorid	MERCK
Kaliumchlorid	MERCK
Kalziumchlorid	MERCK
Magnesiumchlorid	MERCK
Dinatriumhydrogenphosphat	MERCK
Kaliumdihydrogenphosphat	MERCK
Rubidiumchlorid	ROTH
Kaliumacetat	ROTH
MOPS-Na-Salz	ROTH
Tris-Base	ROTH
Salzsäure	MERCK

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	MERCK
Essigsäure	MERCK
Natriumhydroxid	MERCK
Ethidiumbromidlösung	ROTH
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Xylenecyanol	ROTH
Glycerol	ROTH
Dimethylformamid	MERCK
Natriumdodecylsulfat (SDS)	ROTH
β-Mercaptoethanol	ROTH
Coomassieblue G-250	Sigma-Aldrich
Harnstoff	ROTH
Imidazol	ROTH
Ponceau-Pulver	Sigma-Aldrich
Sulfosalicylsäure	MERCK
Trichloressigsäure	MERCK
Methanol	MERCK
Ethanol	MERCK
Isopropanol	MERCK
Phenolrot	MERCK
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	ROTH
Triton X100	Appli Chem
Bicarbonat	GIBCO
Ampicillin	ROTH
Kanamycin	ROTH

Substanz**Firma**

Sea Kem LE Agarose	LONZA
Ni-NTA-Agarose	Qiagen
Polypropensäule	Qiagen
10%ige NuPAGE Novex Bis-Tris-Midi-Gele	Invitrogen
SimplyBlue™ Safe Stain	Invitrogen
NCP Nitrozellulosemembran, Porengröße 0,45µm	Macherey-Nagel
Whatmanpapier	Hartenstein
Fetal Bovine Serum	GIBCO
Fetal Bovine Serum (FBS)	GIBCO
Antibiotika-Antimytikum	GIBCO

L-Glutamin	GIBCO
NEA – Non Essential Amino Acids	GIBCO
1xTrypsin-EDTA	GIBCO
Difco™ LB Agar	Becton & Dickinson
LB Broth Base	Invitrogen

2.1.3 Medien

Medium	Firma
MEM- Minimum Essential Medium	GIBCO
L-15-Leibovitz-Medium mit Glutamin	GIBCO
BME-Basal Medium Eagle	GIBCO

2.1.4 Zelllinie

Zelllinie	Quelle
MRC5 - humane Fibroblasten	American Type Culture Collection

2.1.5 Bakterien- und Virusstämme

Bakterienstamm	Firma
One Shot®TOP10	Invitrogen
BL21(DE3)	Novagen

Virusstamm	Quelle
HCMV AD169	Bestand des Universitätsklinikums
HHV6 A u. B	Patientenplasma

2.1.6 Plasmide

Vektor	Firma
pCR [®] II-TOPO [®] -Plasmid	Invitrogen
pet 28a (+)	Novagen

2.1.7 Enzyme

Enzym	Firma
EcoRI	Fermentas
NotI	Fermentas
BamHI	Fermentas
Shrimp Alkaline Phosphatase	Fermentas
T ₄ DNA-Ligase	Fermentas

2.1.8 DNA-Marker und Proteinmarker

Marker	Firma
1kb DNA-Marker	Invitrogen
Protein-Marker 10-200kDa	Fermentas

2.1.9 Kits

Kit	Firma
TOPO TA Cloning [®]	Invitrogen
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen
Taq PCR Core Kit	Qiagen
Gene Clean Turbo Kit	Q BIO Gene
DyeEx 2.0	Qiagen
Pierce BCA [™] Protein Assay Kit	Thermo Scientific
recomBlot CMV IgG	Mikrogen
Human Herpesvirus 6 IgG ELISA	Panbio

2.1.10 Primer

Tabelle 2: Primer für DNA-Amplifikation

Primername	Sequenz (5'=>3')	Erreger/ Protein Proteinsequenz
HCMV gB-n-f	TGGTGTGTGGATCAACGGCG	HCMV/ Glykoprotein B aa505-894
HCMV gB-n-r	GTAGCCGTTTTTTCGATGTCGC	HCMV/ Glykoprotein B aa505-894
HCMVgB-F2-f	GAATTCTACAACAAACCGATTGCCGCG	HCMV/ Glykoprotein B aa532-653
HCMV-gB-F2-r	GCGGCCGCATCCAGGGCGATCATGCTG	HCMV/ Glykoprotein B aa532-653
HCMV-gB-F3-f	GAATTCACGCAGCCGCTGCAGAA	HCMV/ Glykoprotein B aa779-907
HCMV-gB-F3-r	GCGGCCGCGACGTTCTTCTTCGTCGGA GT	HCMV/ Glykoprotein B aa779-907
HCMV-pp150-n-f	CTGCAGCAACGTCAGCAGCAAC	HCMV/ pp150 aa403-1000
HCMV-pp150-n-r	TTTCATGCCCGTCGTGCTCTTG	HCMV/ pp150 aa403-1000
HCMV-pp150-F1-f	GAATTCGCACGTAAACCGAGCGCCTC	HCMV/ pp150 aa414-551
HCMV-pp150-F1-r	GCGGCCGCCGTGTCCGGTCAAACGCGGAT	HCMV/ pp150 aa414-551
HCMV-pp150-F2-f	GAATTCGCGGCTTTCAGTCTCGTCTC	HCMV/ pp150 aa491-698
HCMV-pp150-F2-r	GCGGCCGCAACCTCATCAGCGGCGTCC	HCMV/ pp150 aa491-698
HCMV-pp150-F3-f	GAATTCGACCGCGCTGATGAGGTTTGG	HCMV/ pp150 aa694-975
HCMV-pp150-F3-r	GCGGCCGCCGCCCGGTTTCAGGAT	HCMV/ pp150 aa694-975
HCMV-pp65-n-f	ATGGAGTCGCGCGGTCGCCGTTGT	HCMV/ pp65 aa1-561
HCMV-pp65-n-r	ACCTCGGTGCTTTTTGGGCGT	HCMV/ pp65 aa1-561
HCMV-pp65-F1-f	GAATTCGAAATGATATCCGTAAGTGGTCCC A	HCMV/ pp65 aa10-183
HCMV-pp65-F1-r	GCGGCCGCCGTGTAGTAGACGTCGGGCTC TTTC	HCMV/ pp65 aa10-183
HCMV-pp65-F2-f	GAATTCTGGAAAGAGCCCGACGTCTACTAC AC	HCMV/ pp65 aa175-376
HCMV-pp65-F2-r	GCGGCCGCCTGGATGCGATACTGGCTGGT GAAG	HCMV/ pp65 aa175-376
HCMV-pp28-n-f	GGTGCCGAACCTCTGCAAACG	HCMV/ pp28 aa1-171

Primername	Sequenz (5'=>3')	Erreger/ Protein Proteinsequenz
HCMV-pp28-n-r	CTTCTTTTGGCGCGGAGTCCT	HCMV/ pp28 aa1-171
HCMV-pp28-F1-f	GAATTCACCACGCCCGGTGAGCC	HCMV/ pp28 aa15-51
HCMV-pp28-F1-r	GCGGCCGCGTCGTCATCGTCCTCCCCTT	HCMV/ pp28 aa15-51
HCMV-pp28-F2-f	GAATTCCAGGAGACGGACGACCTAGACG	HCMV/ pp28 aa129-166
HCMV-pp28-F2-r	GCGGCCGCAGTCCTGGGTGTGTGGGC	HCMV/ pp28 aa129-166
HCMV-pp52-n-f	TACAAGACGGCTATCCAGCAGC	HCMV/ pp52 aa20-403
HCMV-pp52-n-r	GCCGGAGTTGCGATCCAAA	HCMV/ pp52 aa20-403
HCMV-pp52-F1-f	GAATTCTTTCTCACCGAGGAACCTTTCC	HCMV/ pp52 aa266-293
HCMV-pp52-F1-r	GCGGCCGCGCCGCCGCCACGC	HCMV/ pp52 aa266-293
HHV6 A-gL-F-f	GGATCCTTACTAACCTTCTCGAAAGCGATG C	HHV6 gL aa12-242
HHV6 A-gL-F-r	GCGGCCGCGCGGGAAGTTCGGAAAGGT	HHV6 gL aa12-242
HHV6 A-U47-n-f	ATGCATTTGGAGGTCATCGTCC	HHV6 A/ U47 aa1-650
HHV6 A-U47-n-r	CTCTGTAGATCGTCCCCTGATTGT	HHV6 A/ U47 aa1-650
HHV6 A-U47-F2-f	GGATCCATGTACACCCCAACCGACAT	HHV6 A/ U47 aa341-650
HHV6 A-U47-F2-r	GCGGCCGCCTCTGTAGATCGTCCCCTGAT	HHV6 A/ U47 aa341-650
HHV6 B-U47-n-f	ATGCTTCACATCTCGCGACTCG	HHV6 B/ U47 aa1-723
HHV6 B-U47-n-r	ATGCGTTGCATTTTGGGTTGA	HHV6 B/ U47 aa1-723
HHV6 B-U47-F2-f	GGATCCCTTACAATCCGTCGTAACGC	HHV6 B/ U47 aa321-727
HHV6 B-U47-F2-r	GCGGCCGCGTTGTATGTGTAATGCGTTGC A	HHV6 B/ U47 aa321-727
HHV6 B-U47-F6-f	GAATTCGCTTTACCATCTAGTAATTCATCAC ACTC	HHV6 B/ U47 aa542-644
HHV6 B-U47-F6-r	GCGGCCGCAGTCGTTAGCTGTGTTGTGAT ATGATT	HHV6 B/ U47 aa542-644
HHV 6 B gB-n-f	TTCGTCACCCCAAGGATTCTT	HHV6 B/ gB aa321-407
HHV 6 B gB-n-r	TCTAGACTTGACATCCACCAAATCTCG	HHV6 B/ gB aa321-407

Primername	Sequenz (5'=>3')	Erreger/ Protein Proteinsequenz
HHV 6 B gB-F1-f	GAATTCCAAACGTGTATTAAGAATGAATTT GAG	HHV6 B/ gB aa335-395
HHV 6 B gB-F1-r	GCGGCCGCTAAGTTTACTGAACCCTGCTC AAGA	HHV6 B/ gB aa335-395
HHV 6 A gB-n-f	GCTTTCGTCGCCCCCAAG	HHV6 A/ gB aa320-407
HHV 6 A gB-n-r	TCTAGACTTAACATCCCCCACATCTC	HHV6 A/ gB aa320-407
HHV 6 A gB-F1-f	GAATTCCAAACGTGTATTAAGAATGAATTT GAA	HHV6 A/ gB aa335-395
HHV 6 A gB-F1-r	GCGGCCGCTATTTTTTCCGAACCCTGCTC	HHV6 A/ gB aa335-395
HHV6 A-pp100-n-f	GCATTTTCGATGTCTGAGATTGG	HHV6 A/ pp100 aa282-853
HHV6 A-pp100-n-r	CGGCCAGAGACGGTGTTTTTCAT	HHV6 A/ pp100 aa282-853
HHV6 A-pp100-F1-f	GAATTCGATTTTCGTCCCTTTACGCG	HHV6 A/ pp100 aa295-576
HHV6 A-pp100 -F1-r	GCGGCCGCCACCTCGCGTGAGTGCATT	HHV6 A/ pp100 aa295-576
HHV6 A-pp100-F2-f	GGATCCGCTATAATGCACTCACGCGAGGT	HHV6 A/ pp100 aa569-852
HHV6 A-pp100-F2-r	GCGGCCGCCGCCAGAGACGGTGTTTT	HHV6 A/ pp100 aa569-852
HHV6 B-pp100-n-f	AAAGCATTTTCGGTGCCTGAG	HHV6 B/ pp100 aa280-855
HHV6 B-pp100-n-r	GATCACTGACTTGTCTTTGGCAGCT	HHV6 B/ pp100 aa280-855
HHV6 B-pp100-F1-f	GAATTCAAAGCATTTTCGGTGCCTGAG	HHV6 B/ pp100 aa280-614
HHV6 B-pp100-F1-r	GCGGCCGCGTCCCTGCTATTTCTTTCCC C	HHV6 B/ pp100 aa280-614
HHV6 B-pp100-F2-f	GGATCCGCTCGTGACGTATCAAGAGGG	HHV6 B/ pp100 aa581-839
HHV6 B-pp100-F2-r	GCGGCCGCCCCAGGGACGGTTTCTTCA	HHV6 B/ pp100 aa581-839

f... forward

r... reverse

n... nested Primer, äußerer Primer

F1... Fragment 1

F2... Fragment 2

2.2 Methoden

2.2.1 Expression der HCMV- und HHV6-Antigene

2.2.1.1 Klonierung der Zielsequenzen in den Expressionsvektor

Zur rekombinanten Herstellung der viralen Antigene wurden von den beschriebenen antigenen Strukturproteinen und Nichtstrukturproteinen der HCMV- und HHV6-Viren Proteinbereiche ausgewählt und deren DNA-Sequenzen amplifiziert und über zwei Klonierungsschritte in den Expressionsvektor pet28a(+) kloniert. Die für die Amplifikation notwendige Virus-DNA (HCMV und HHV6) wurde aus dem Zellkulturüberstand von mit HCMV infizierten MRC5-Zellen und aus Patientenplasmen extrahiert.

2.2.1.1.1 Zellkultur

2.2.1.1.1.1 verwendete Zelllinien

Für die Produktion des humanen Zytomegalievirus kamen MRC5-Zellen zum Einsatz. MRC5-Zellen sind humane fetale Lungenfibroblasten, die adhären auf Zellkulturflaschen wachsen. Die Zelllinie wurde bei der American Type Culture Collection erworben.

2.2.1.1.1.2 Kultivierung der MRC5-Zellen

Die aufgetauten MRC5-Zellen wurden in einer T25-Kulturflasche (Nunc) mit 30ml 10% MEM-Medium kultiviert. Nach 24h fand dann ein Mediumwechsel statt. Dazu wurde das verbrauchte Medium in eine Abfallflasche gegossen und die Zellen mit 3ml 1x PBS gewaschen. Anschließend wurde erneut 30ml 10%iges MEM-Medium auf die Zellen gegeben. Nach 4-5 Tagen wurden die Zellen in einem Verhältnis 1:2 auf zwei Kulturflaschen verteilt.

10%-MEM-Medium: 500ml MEM-Minimum Essential Medium
 50ml 1x L-15-Leibovitz-Medium mit Glutamin
 55ml Fetal Bovine Serum
 5ml Antibiotika-Antimykotikum

1x PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung):	137mM NaCl
	2,7mM KCl
	6,5mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O
	1,5mM KH ₂ PO ₄

2.2.1.1.1.3 Passagieren der MRC5-Zellen

Das verbrauchte Kulturmedium wurde in eine Abfallflasche gegossen. Anschließend wurden die MRC5-Zellen mit 1ml 1xTrypsin-EDTA unter Verwendung einer T25-Kulturflasche (Nunc) bzw. 3ml unter Verwendung einer T75-Kulturflasche (Nunc) gewaschen. Dazu wurde das 1xTrypsin-EDTA in die Zellkulturflaschen pipettiert und direkt danach abgegossen. Im folgenden Schritt wurden die adhären den MRC5-Zellen mit dem 1x Trypsin-EDTA vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Es wurden jeweils 1,5ml bzw. 3ml 1xTrypsin-EDTA bei Verwendung einer T25-Kulturflasche bzw. einer T75-Kulturflasche in die Zellkulturflaschen pipettiert. Nach einer Einwirkzeit von 5-10min wurde die Kulturflasche geschwenkt und anschließend die Zellen durch auf- und abpipettieren vereinzelt. Die Kulturflaschen wurden danach mit 30ml bzw. 120ml frischem 5%MEM-Medium befüllt. Zum Schluß fand die Überführung der Zellsuspension zu drei gleichen Teilen in die neuen T25- bzw. T75-Kulturflaschen (Nunc) statt.

5%-MEM-Medium:	500ml MEM-Minimum Essential Medium
	50ml 1x L-15-Leibovitz-Medium mit Glutamin
	27,5ml Fetal Bovine Serum
	5ml Antibiotika-Antimykotikum

2.2.1.1.2 Infektion der MRC5-Zellen mit humanen Zytomegalievirus (HCMV)

Die Infektion der MRC5-Zellen erfolgte mit dem Ad169-Stamm. Die MRC5-Zellen in einer T75-Kulturflasche wurden mit 1ml Saatvirus infiziert und mit 2%BME-Medium weiter kultiviert.

2% BME-Medium:	100ml BME
	100ml 1x L-15-Leibovitz-Medium mit Glutamin
	2ml 100x L-Glutamin
	2ml 100x NEA – Non Essential Amino Acids
	4ml FKS – Foetal Bovine Serum
	2ml 7,5% Bicarbonat
	1ml Antibiotika-Antimykotikum

Zur Extraktion der HCMV-Virus-DNA wurde 1ml Zellkulturüberstand der infizierten MRC5-Zellen in ein 1,5ml Eppendorfgefäß überführt.

2.2.1.1.3 Extraktion der Virus-DNA mit QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen)

Die Extraktion der Virus-DNA (HCMV; HHV6) erfolgte nach dem Protokoll von *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (Qiagen). Aus dem Zellkulturüberstand der mit humanen Zytomegalievirus (HCMV, Stamm: Ad169) infizierten MRC5-Zellen wurde die HCMV-DNA extrahiert. Die HHV6-DNA hingegen wurde aus den Plasmen von Patienten extrahiert. In 1,5ml Eppendorfgefäße wurde jeweils 20µl Qiagen-Protease vorgelegt und anschließend jeweils 200µl der Probe (Patientenplasma) hinzugefügt. Nachdem alles ordentlich gemischt war, kamen 200µl Puffer *AL* zu den Probenpuffergemischen hinzu. Die Probengemische wurden dann für 15s gevortext und für 10min bei 56°C im Thermomixer inkubiert. Nach der Inkubation wurden jeweils 200µl 96%-iges Ethanol zu den Probengemischen hinzu gegeben und für 15s gevortext. Die QIAamp Mini-Säulen wurden danach mit den Probenpuffergemischen beladen und bei 13000rpm für 1min zentrifugiert. Die Durchflüsse mussten nach diesem und in den folgenden Schritten verworfen werden. Auf die beladenen Säulen wurde anschließend erst 500µl *AW1-Puffer* pipettiert und diese für 1min bei 13000rpm zentrifugiert. Danach wurde 500µl *AW2-Puffer* auf die Säulen gegeben und diese für 3min bei 13000rpm zentrifugiert. Im folgenden Schritt wurden die Säulen für 5min bei 13000rpm trocken zentrifugiert. Die Eluation der an die Säulen gebundenen DNA erfolgte mit 200µl *Puffer AE*. Dazu wurden 200µl *AE-Puffer* auf die Säule pipettiert und diese für 1min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Säulen für 1min bei 13000rpm zentrifugiert. Mit der eluierten DNA konnte danach sofort die PCR-Reaktion durchgeführt werden. Bei längeren Wartezeiten wurde die Virus-DNA bei -20°C eingefroren.

Alle Zentrifugationsschritte erfolgten mit der Biofuge-Zentrifuge (Heraeus).

2.2.1.1.4 Amplifikation ausgewählter DNA-Sequenzbereiche mittels „nested“ PCR

Mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion (PCR) kann man spezifisch DNA-Abschnitte vervielfältigen. Die nested PCR (geschachtelte PCR) ist eine Variante der Standard-PCR, bei der ein zweites Primerpaar verwendet wird, um aus einer Mischung an DNA-Molekülen den spezifischen DNA-Abschnitt zu amplifizieren und Nebenprodukte zu unterbinden. Das erste Primerpaar (das „Äußere Primerpaar“) amplifiziert in einer Standard-PCR-Reaktion einen großen DNA-Bereich. Das zweite Primerpaar (das „Innere Primerpaar“), welches auch als „nested Primer“ bezeichnet wird, bindet innerhalb des ersten PCR-Produkts und trägt artifizielle Schnittstellen. Die Bindung der modifizierten Primer an das Template wird durch die artifiziellen Schnittstellen erschwert. Jedoch wird durch eine ausreichende Menge an

Template durch die 1. PCR und durch niedrige Annealing-Temperaturen eine Bindung des Primerpaar gewährleistet. Das zweite PCR-Produkt ist immer kleiner als das erste PCR-Produkt.

2.2.1.1.4.1 PCR-Ansatz mit Taq PCR Core Kit (Qiagen)

Mit der extrahierten HCMV- bzw. HHV6-DNA wurden die Standard-PCR-Reaktionen angesetzt. Folgende Komponenten wurden in die PCR-Reaktionsgefäße pipettiert.

Tabelle 3: Pipettierschema für den PCR-Ansatz

Komponente	Volumen	Endkonzentration bzw. Menge
10x Coral Load Puffer	5µl	1x
MgCl ₂ (25mM)	1µl	2mM
dNTP-Mix (10mM pro Nukleotid)	2µl	400µM pro Nukleotid
Forward Primer (5pmol)	5µl	25pmol
Reverse Primer (5pmol)	5µl	25pmol
Taq DNA-Polymerase	0,5µl	2,5 Units pro Reaktion
Dest. H ₂ O	26,5µl	
extrahierte DNA	5µl	
Endvolumen	50µl	

Mit den aus den Agarosegelen aufgereinigten PCR-Produkten (Gene Clean Turbo Kit) wurde die 2. Standard-PCR-Reaktion angesetzt.

2.2.1.1.4.2 PCR-Programm

Die PCR-Reaktionen erfolgten im Mastercycler *gradient*.

Tabelle 4: PCR-Programm

Amplifikations-schritt	Phase	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	Denaturation	95°C	120sec	1
2	Denaturation	95°C	15sec	29
3	Annealing	60°C	20sec	
4	Elongation	72°C	90sec	
5	End-Elongation	72°C	420sec	1
6	Kühlung	4°C	∞	

Die Annealingtemperatur der 1. PCR-Reaktion betrug 60°C, die der 2. PCR-Reaktion 55°C.

2.2.1.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode, um z.B. DNA-Fragmente ihrer Größe nach zu trennen. Während die größeren DNA-Fragmente langsamer laufen und im oberen Bereich des Gels zu sehen sind, findet man die kleineren und dadurch schneller laufenden DNA-Fragmente im unteren Bereich des Gels.

2.2.1.1.5.1 Herstellung des 1%-igen Agarosegels

Für die Herstellung eines 1%-igen Agarosegels wurde 1g Agarose eingewogen und in 100ml TAE-Puffer durch Erwärmen gelöst. Nachdem die Agaroselösung auf ca. 60°C abgekühlt war, wurde 3µl Ethidiumbromidlösung (10mg/ ml) zur Agaroselösung pipettiert und diese dann in die vorbereitete Gelkammer gegossen.

Sea Kem LE Agarose

TAE-Puffer pH 8,0: 40mM Tris-Base
1mM Na₂EDTA; pH8,0
20mM Essigsäure

Ethidiumbromidlösung: 10mg/ 1ml

2.2.1.1.5.2 Elektrophoreselauf

Die DNA-Proben wurden in 1-fach Ladepuffer aufgenommen und das Agarosegel wurde mit den Proben beladen. Das Gel lief bei 120V ca. 50min.

10x Ladepuffer: 0,25% Bromphenolblau
 0,25% Xylene Cyanol
 100mM Tris-HCL, pH 8,0
 50mM Na₂EDTA; pH8,0
 60% Glycerin

Marker: 1kb DNA-Marker (Invitrogen)

2.2.1.1.6. Aufreinigung der PCR-Produkte mit dem Gene Clean Turbo Kit (Q BIO Gene)

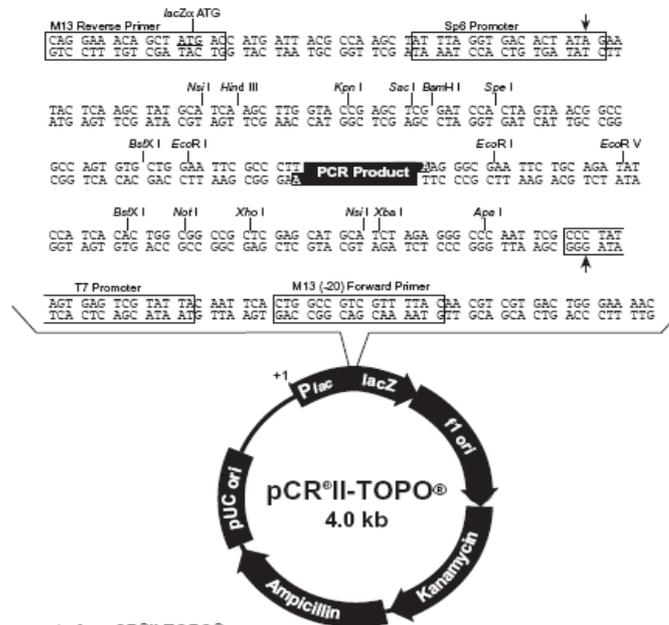
Die Aufreinigung der PCR-Produkte aus den Agarosegelen erfolgte nach dem Protokoll von Q BIO Gene. Die ausgeschnittenen Agarosegelstücke wurden mit *GeneClean Turbo Salt Solution* vermischt (0,1g Gel/ 100µl Puffer) und so lange auf 55°C erhitzt, bis sich die Gele verflüssigt hatten (ca. 5min). Anschließend wurden auf die *Turbo Säulen* die Gelflüssigkeiten pipettiert. Danach erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 5s bei 8600rpm. Die Durchflüsse mussten in diesem und in dem folgenden Schritt verworfen werden. Im Anschluss wurde auf die Säulen die 500µl *Turbo Wash Solution* pipettiert und diese dann zunächst für 5s bei 8600rpm zentrifugiert sowie danach für weitere 4min bei 8600rpm trocken zentrifugiert. Im folgenden Schritt erfolgte mit 30µl *Turbo Elution Solution* die Eluation der DNA von den Säulen. Dazu wurden 30µl *Turbo Elution Solution* auf die Säulen pipettiert und diese für 1min inkubiert. Zum Schluß wurden diese für 5min bei 8600rpm zentrifugiert.

Alle Zentrifugationsschritte erfolgten mit der Biofuge-Zentrifuge (Heraeus).

2.2.1.1.7 Topo-TA-Klonierung (Invitrogen)

Die Topo-TA-Klonierung (Invitrogen) ist eine einfache Methode, um ein mit der Taq-DNA-Polymerase (Invitrogen) amplifiziertes PCR-Produkt in das pCR[®]II-TOPO[®]-Plasmid einzubauen. Während der PCR-Reaktion hängt die Taq-Polymerase, die eine Transferaseaktivität besitzt, Desoxyadenosine an das 3'Ende des PCR-Produktes an. Das pCR[®]II-TOPO[®]-Plasmid trägt überhängende 3'Desoxythymidinreste. Topoisomerasen I sind kovalent über Tyrosilreste an die 3'Phosphatenden der Desoxythymidinreste an das linearisierte pCR[®]II-TOPO[®]-Plasmid gebunden. Die kovalente Bindung der Desoxyadenosine des PCR-Produktes an die Desoxythymidinreste des pCR[®]II-TOPO[®]-

Plasmids führt auf Grund der räumlichen Annäherung des 5'Hydroxylendes des PCR-Produktes zur Auflösung der Phosphotyrosylbindung und zur Freisetzung der Topoisomerase I.



Comments for pCR®II-TOPO®
3973 nucleotides

LacZα gene: bases 1-589
M13 Reverse priming site: bases 205-221
Sp6 promoter: bases 239-256
Multiple Cloning Site: bases 269-383
T7 promoter: bases 406-425
M13 (-20) Forward priming site: bases 433-448
f1 origin: bases 590-1027
Kanamycin resistance ORF: bases 1361-2155
Ampicillin resistance ORF: bases 2173-3033
pUC origin: bases 3178-3851

Abb. 1.: Plasmidkarte des pCR®II-TOPO®-Plasmids (Quelle: Invitrogen)

2.2.1.1.7.1 Topo TA Klonierungsreaktion (Invitrogen)

Die Klonierungsreaktion wurde wie folgt in die Reaktionsgefäße pipettiert.

Tabelle 5: Pipettierschema für die Topo-TA-Klonierungsreaktion

Komponente	Volumen
aufgereinigtes PCR-Produkt	4µl
Salzlösung	1µl
pCR®II-TOPO®-Vektor (10ng/1µl)	1µl
Endvolumen	6µl

Der Klonierungsansatz wurde bei RT für 30min inkubiert.

Salzlösung:	1,2M NaCl 0,06M MgCl ₂
pCR [®] II-TOPO [®] -Vektor-Lösung:	10ng/1µl Plasmid-DNA 50% Glycerol 50mM Tris-HCl pH 7,4 1mM EDTA 2mM DTT 0,1% Triton X-100 100µg/ml BSA Phenolrot

2.2.1.1.8 Transformation der Topo-Vektoren in TOP10 Zellen (Invitrogen)

2µl der Topo-Klonierungsreaktion wurden mit 100µl TOP10-Zellen vorsichtig in den Eppendorfgefäßen vermischt und für 30min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Bakterienzellen für 30sek in einem Wasserbad bei 42°C geschockt und anschließend sofort auf Eis überführt. Danach erfolgte die Zugabe von 250µl SOC-Medium (Invitrogen). Nachdem die Zellsuspensionen 1h auf einem Thermomixer bei 37°C geschüttelt hatten, wurden 200µl der Bakteriensuspensionen auf die Amp-Selektiv-Agarplatten ausplattiert, die zuvor mit 40µl Xgal (40mg/ml) inkubiert wurden. Die bestrichenen Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Soc-Medium (Invitrogen):	2%Trypton 0.5% Hefeextrakt 10mM NaCl 2,5mM KCl 10mM MgCl ₂ 10mM MgSO ₄ 20mM Glukose
--------------------------	---

X-Gal: 20mg/ml Dimethylformamid

Agarplatten:	40g (4%) für 1 l Difco TM LB Agar mit Aqua dest. auffüllen 100µg/ml Ampicillin autoklavieren
--------------	--

Top10: chemisch kompetente Bakterienzellen
F-mcr AΔ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74
recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R)
endA1 nupG

2.2.1.1.9 Mini-Plasmidpräparation

2.2.1.1.9.1 5ml Kulturen

In Glasröhrchen wurden 5ml LB-Medium (amp) vorgelegt. Mit einer Pipettenspitze wurden anschließend die Bakterienkolonien von einer LB-amp-Platte gepickt und in das 5ml LB-Medium (amp) überführt. Die Bakterienkulturen mussten über Nacht (für ca. 16h) bei 37°C und 200rpm kultiviert werden.

1x LB-Medium (flüssig und autoklaviert): 8g (0,8%) LB Broth Base
auf 1l Aqua dest.
100µg/ml Ampicilin

2.2.1.1.9.2 DNA-Aufreinigung nach QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen)

Die Aufreinigung der DNA aus den Minikulturen erfolgte nach dem Protokoll von QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen).

2ml Bakteriensuspension wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und für 10min bei 13000rpm zentrifugiert. Die Resuspension und Lyse der Bakterienpellets erfolgte zuerst in 250µl *Puffer P1* (enthält Rnase) und danach in 250µl *Puffer P2*. Nachdem jeweils 350µl *Puffer N3* zu den Bakterienlysaten gegeben wurden, mussten die Probengemische für 10min bei 13.000rpm zentrifugieren. Die Überstände wurden dann auf die QIAprep-Säulen pipettiert und diese wurden im Folgenden für 1min bei 13000rpm zentrifugiert. Die Durchflüsse mussten in diesen und in den folgenden Schritten verworfen werden. Anschließend wurden auf die Säulen 500µl *PB-Puffer* pipettiert und erneut für 1min bei 13000rpm zentrifugiert. Danach erfolgte das Waschen der Säulen mit 750µl *PE-Puffer* nach der gleichen Methode. Nachdem die Säulen für 1min bei 13000rpm trocken zentrifugiert wurden, erfolgte im letzten Schritt mit 50µl *EB-Puffer* die Eluation der DNA von den Säulen. Dazu wurde 50µl *EB-Puffer* auf die Säulen pipettiert und diese nach 1min Inkubationszeit für 1min bei 13000rpm zentrifugiert.

Alle Zentrifugationsschritte erfolgten mit der Biofuge-Zentrifuge (Heraeus).

2.2.1.1.10 Analytischer Topo-Plasmid-Verdau mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und NotI

Restriktionsverdau sind eine Möglichkeit, um die Richtigkeit der rekombinanten Plasmide und der eingesetzten DNA-Fragmente zu überprüfen. Restriktionsendonukleasen erkennen eine spezifische DNA-Sequenz und schneiden innerhalb dieser. Die Molekülgrößen der Plasmide und der DNA-Fragmente wurden mittels Agarosegelelektrophorese überprüft.

2.2.1.1.10.1 Reaktionsansatz

Die Komponenten für die Restriktionsverdau wurden wie folgt in die Reaktionsgefäße pipettiert.

Tabelle 6: Pipettierschema für den Restriktionsverdau

Komponenten	Volumen
Plasmid-DNA	5µl
10 x Puffer orange	1,5µl
Enzym 1 EcoR1 10u/ 1µl	0,5µl
Enzym 2 NotI 10u/ 1µl	0,5µl
Aqua dest.	7,5µl
Endvolumen	15µl

Die Verdau wurden für 2h bei 37°C inkubiert.

2.2.1.1.11 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung ist die beste Möglichkeit, DNA-Sequenzen auf ihre Richtigkeit zu überprüfen. Die Kettenabbruch-Methode (Didesoxymethode nach Sanger) ist eine Methode, um DNA zu sequenzieren. Ähnlich einer PCR benötigt man für diese Methode einen Primer, der an die zu sequenzierende DNA bindet. Die DNA wird durch die DNA-Polymerase komplementär zur DNA verlängert. Dem Reaktionsgemisch sind fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleosidtriphosphate zugegeben. Bindet die DNA-Polymerase ein Didesoxynukleosidtriphosphat an den DNA-Strang, kommt es zum Kettenabbruch, da es keine 3'Hydroxygruppe besitzt. Es entstehen DNA-Moleküle von unterschiedlicher Länge, die abhängig vom Nukleotid unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe tragen. Die Kettenabbruchprodukte werden mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und mit einem Laser zur Fluoreszenz angeregt.

Mit einem Detektor werden die Emissionen der Fluoreszenzfarbstoffe gemessen und ein Chromatogramm erstellt.

2.2.1.1.11.1 PCR-Reaktionsansatz für DNA-Sequenzierung

Die Reaktionsansätze für die Sequenzier-PCRs wurden wie folgt in die Reaktionsgefäße pipettiert.

Tabelle 7: Pipettierschema für den PCR-Ansatz

Komponenten	Volumen
Vektor DNA	100ng/µl
Big Dye Sequenziermix	2µl
Primer (forward bzw. reverse) (5pmol/ 1µl)	1µl
Aqua dest.	4,5µl
Endvolumen	10µl

2.2.1.1.11.2 PCR-Programm für DNA-Sequenzierung

Tabelle 8: PCR-Programm

Amplifikations-schritt	Phase	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	Denaturation	95°C	120sec	1
2	Denaturation	95°C	10sec	25
3	Annealing	55°C	5sec	
4	Elongation	60°C	240sec	
5	Kühlung	4°C	∞	

2.2.1.1.11.3 Aufreinigung des PCR-Produktes zur Sequenzierung mit DyeEx 2.0 (Qiagen)

Die Aufreinigungen der Sequenzierreaktionen erfolgten nach dem Protokoll von DyeEx 2.0 (Quiagen). Im ersten Schritt wurden die Säulen für wenige Sekunden gevortext. Anschließend wurden die Säulen, deren Bodenverschlüsse zuvor abgebrochen und deren Deckel um eine Viertel Drehung geöffnet wurden, in 2ml Sammelgefäße gestellt. Die bei 2800rpm zentrifugierten Säulen wurden danach in neue Eppendorfgefäße (1,5ml) überführt. Dann mussten die Sequenzierreaktionen auf die Säulen pipettiert werden. Als nächstes erfolgte die Eluation der Sequenzierreaktionen von den Säulen durch einen 3min dauernden Zentrifugationsschritt bei 2800rpm. Die gereinigten PCR-Produkte wurden anschließend in

einer Vakuumzentrifuge für ca. 35min bei 42°C und 13000rpm getrocknet. Das Resuspendieren der Proben und das Beladen der Kapillaren bzw. des Plattensequenzers erfolgten im PCR-Labor des Institutes für Mikrobiologie, Virologie und Hygiene nach Vorschrift des Herstellers bzw. wurde als externer Auftrag an das Max-Planck-Institut weitergeleitet.

2.2.1.1.12 Umklonierung der Zielsequenzen in den Expressionsvektor pet 28a (+) (Novagen)

Als Klonierung bezeichnet man eine Methode, mit der ein beliebiges DNA-Fragment in ein Plasmid bzw. Vektor eingebaut werden kann. Die mit Hilfe der TOPO-TA-Klonierung hergestellten DNA-Fragmente wurden aus den pCR®II-TOPO®-Plasmiden mit Restriktionsenzymen ausgeschnitten und in den Expressionsvektor (pet 28a (+)-Vektor) kloniert. Sowohl die pCR®II-TOPO®-Plasmide, als auch der pet 28a-Vektor wurden mit den Restriktionsenzymen EcoRI und NotI (Fermentas) geschnitten, wobei kompatible überhängende Enden entstanden. Anschließend erfolgten die Ligationen der DNA-Fragmente mit dem pet 28a (+)-Vektor. Der pet 28a (+)-Vektor mit dem ligierten DNA-Fragment wurde im nächsten Schritt in kompetente BL21-Bakterienzellen transformiert. Die Vektor-tragenden Bakterienzellen wurden dann durch die Antibiotika-Resistenz auf einer LB-Agarplatte selektioniert.

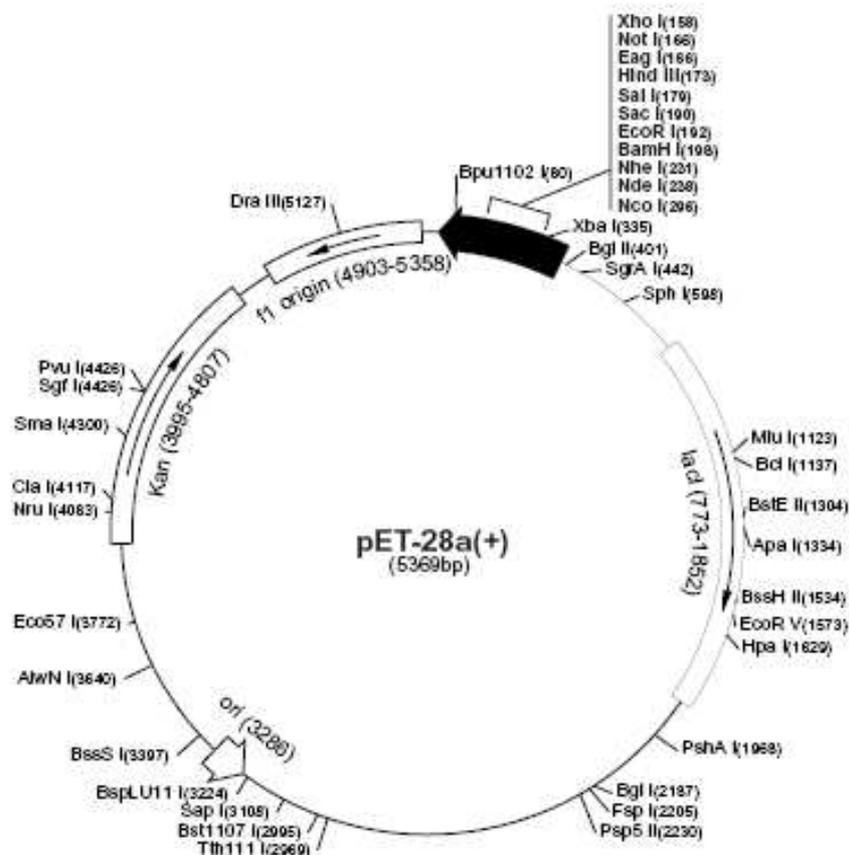


Abb. 2.: Vektorkarte des pET-28a(+)-Plasmides (Quelle: Novagen)

2.2.1.1.12.1 Restriktionsverdau der pCR[®]II-TOPO[®]-Plasmide und des pet 28a (+)-Vektors mit EcoRI und NotI

Die pCR[®]II-TOPO[®]-Plasmide sowie der Zielvektor (pet 28a (+)) wurden mit den Restriktionsenzymen EcoRI bzw. BamHI und NotI verdaut.

2.2.1.1.12.1.1 Reaktionsansatz

Die Reaktionsansätze für die Restriktionsverdau der pCR[®]II-TOPO[®]-Plasmide und des pet 28a (+)-Vektors wurden wie folgt in die Reaktionsgefäße pipettiert.

Tabelle 9: Pipettierschema

Komponenten	Volumen
Plasmid-DNA	5µl (µg)
10 x Puffer orange	1,5µl
Enzym 1 EcoR1 bzw. BamHI (10u/ 1µl)	0,5µl
Enzym 2 NotI (10u/ 1µl)	0,5µl
Aqua dest.	7,5µl
Endvolumen	15µl

Die Verdau wurden für 2h bei 37°C inkubiert. Die Auftrennung der Restriktionsverdau mittels Agarose-Gelelektrophorese und die Aufreinigung der geschnittenen DNA aus dem Agarosegel erfolgten wie unter den Punkten 2.2.1.1.5 und 2.2.1.1.6 beschrieben.

2.2.1.1.12.2 Dephosphorylierung des pet 28a (+)-Vektors

Die durch die Alkalische Phosphatase katalysierte Dephosphorylierung der Vektorenden verhindert die Re-Ligation des linearisierten Vektors.

2.2.1.1.12.2.1 Reaktionsansatz

Der Reaktionsansatz für die Dephosphorylierung des pet 28a (+)-Vektors wurde wie folgt in das Reaktionsgefäß pipettiert.

Tabelle 10: Pipettierschema

Komponenten	Volumen
Vektor-DNA	40µl
10 x Puffer	5µl
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) 1u/1µl	1µl
Aqua dest.	3µl
Endvolumen	49µl

Die Reaktion erfolgte für 30min bei 55°C. Anschließend wurde sie bei 65°C (Thermomixer) für 15min gestoppt.

2.2.1.1.12.3 Ligation des pet 28a (+)-Vektors mit den DNA-Fragmenten

Die Ligation ist eine Reaktion, bei der das 3´Ende einer Nukleinsäure mit dem 5´Ende einer weiteren Nukleinsäure zu einer Phosphordiesterbrücke verbunden wird.

Die Ligation wird in der Molekularbiologie benutzt, um Fremd-DNA mit einem linearisierten Vektor zu verknüpfen. Die eingesetzte Ligase katalysiert die Verbindung zwischen dem 3´Hydroxy-Ende und dem 5´Phosphat-Ende.

2.2.1.1.12.3.1 Ligationsansatz

Der Ligationsansatz wurde wie folgt in die Reaktionsgefäße pipettiert.

Tabelle 11: Pipettierschema für den Ligationsansatz

Komponenten	Volumen
Vektor-DNA (pet28a(+))	1µl
Insert-DNA	9µl
Puffer	2µl
Aqua dest.	7µl
T4-DNA-Ligase	1µl
Endvolumen	20µl

2.2.1.1.12.4 Transformation in BL21-Zellen

2µl der Ligationsreaktionen wurden mit 100µl BL21-Zellen vorsichtig vermischt und 30min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Bakterienzellen für 30sek in einem Wasserbad bei 42°C geschockt und anschließend sofort auf Eis überführt. Danach erfolgte

die Zugabe von 250µl SOC-Medium (Invitrogen) und alles wurde für 1h bei 37°C geschüttelt. Am Schluss wurden 200µl der Zellsuspensionen auf die Selektiv-Agarplatten (kan-Resistenz) ausplattiert, die zuvor mit 40µl Xgal (40mg/ml) inkubiert wurden. Das Wachstum der selektierten Bakterienkulturen erfolgte über Nacht bei 37°C im Brutschrank.

Soc-Medium (Invitrogen): 2%Trypton
 0.5% Hefeextrakt
 10mM NaCl
 2,5mM KCl
 10mM MgCl₂
 10mM MgSO₄
 20mM Glukose

2.2.1.1.12.4.1 Herstellung der kompetenten BL21-Zellen

100ml LB-Medium wurde mit 1ml der 5ml BL21 Über-Nacht-Kultur angeimpft. Bei einer Extinktion von 0,2 bis 0,3 (bei 595nm) wurden die Bakterien 30min auf Eis gestellt und anschließend in 50ml Falconröhrchen für 10min bei 4°C und 2500rpm zentrifugiert. Im folgenden Schritt wurden die Bakterienpellets in 20ml Puffer 1 resuspendiert und dann zusammengeführt. Danach wurde die Bakteriensuspension erneut für 10min bei 4°C und 3500rpm zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde das Bakterienpellet unter Vortexen in 4ml Puffer 2 resuspendiert. Nachdem die Bakteriensuspension 15min auf Eis stand, erfolgte die Aliquotierung (100µl Bakteriensuspension je Eppendorfgefäß) in Eppendorfgefäße. Zum Schluss mussten die Bakterien mit 96% Ethanol auf Trockeneis schockgefrostet werden, um sie dann bei -80°C bis zur Verwendung zu lagern.

Puffer 1: 30mM Kaliumacetat
 100mM RbCl
 10mM CaCl₂*2H₂O
 50mM MnCl₂*4H₂O
 in 300ml Wasser lösen
 75ml 99% Glycerin
 pH 5,8 mit 10% Essigsäure einstellen
 auf 500ml mit Wasser auffüllen

Puffer 2: 10mM MOPS-Natriumsalz
 75mM CaCl₂*2H₂O
 10mM RbCl
 in 50ml Wasser lösen
 15ml Glycerin
 pH 6,5 mit NaOH einstellen
 auf 100ml mit Wasser auffüllen

Beide Puffer wurden mit einem Filter von 0,2µm steril filtriert.

2.2.1.1.13 Konservierung der Plasmid tragenden Bakterienklone in einem Glycerolstock

Um die Bakterien mit ihren Plasmiden stabil über längere Zeit in Flüssigmedium zu lagern, wurde den Mini-Bakterienkulturen (5ml, Punkt 2.2.1.1.9.1) 80%iges Glycerol in einem Verhältnis von 1:10 beigemischt und diese bei –80°C eingefroren.

2.2.1.2 Proteinexpression in *E. coli* BL 21 (DE3)-Zellen

Die Expression der viralen Antigene (Fusionsproteine) erfolgte in den BL 21 (DE3)-Zellen. Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert die Transkription der Zielsequenzen und führt zur Expression der viralen Fusionsproteine. Das lacZ-Gen in dem Lactose-Operon ist durch die Zielsequenzen ersetzt worden. IPTG ist ein Galactosederivat und wirkt wie Lactose als Induktor des Lactose Operons in *E. coli*, indem es an den Repressor LacI bindet und damit dessen Wechselwirkung mit dem Operator inhibiert.

2.2.1.2.1 Bakterienvorkultur

In Glasröhrchen wurden 5ml 1x LB-Medium (kan) vorgelegt. Mit einer Pipettenspitze wurden Bakterienzellen aus dem gefrorenen Glycerolstock in das LB-Medium (kan) überführt. Das Wachstum der Bakterienkulturen erfolgte über Nacht (ca. 16h) bei 37°C und 200rpm. Die Zusammensetzung des 1x LB-Mediums ist unter Punkt 2.2.1.1.9.1 dargestellt.

2.2.1.2.2 Expressionskultur

In jeweils 50ml 1x LB-Medium wurde die gesamte Vorkultur überführt. Nachdem die Expressionskulturen für 1h bei 37°C sowie 200rpm geschüttelt hatten, wurden mit einem Photometer die optischen Dichten der Bakterienkulturen bestimmt. Bei einer optischen Dichte (OD₆₀₀) zwischen 0,600 und 0,800 erfolgte mit 50µl Isopropyl-β-D-thiogalacto-

pyranosid (IPTG, 1mM) die Induktion der Proteinexpression. Vor der Induktion wurden den Expressionskulturen jeweils 1ml Probe entnommen und diese für 1min bei 13000rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände verworfen und die Bakterienpellets in 50µl SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Bakterienproben dienten im Vergleich zu den Expressionskulturen als Negativkontrollen. Nach 4h bei 37°C und 200rpm erfolgte die Ernte der Bakterienzellen. Dazu wurden die Expressionskulturen für 10min bei 5000rpm zentrifugiert, die Überstände verworfen und das Bakterienpellet über Nacht bei -20°C eingefroren. Das Einfrieren der Bakterienpellets war notwendig, um einen besseren Aufschluss der Zellen zu ermöglichen. Vor der Ernte der Bakterienzellen wurde jeweils 1ml Probe von den Bakteriensuspensionen als Expressionkontrolle abgenommen, in Eppendorfgefäße überführt und für 1min bei 13000rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und das Bakterienpellet in 100µl Probenpuffer aufgenommen.

SDS-Probenpuffer (2x): 100mM Tris (pH 6.8)
 24% Glycerol
 8% SDS
 2% β-Mercaptoethanol
 0,02% Coomassieblue G-250

2.2.1.3 Aufreinigung der viralen Fusionsproteine über eine Ni-NTA-Agarose-Säule (Qiagen)

Die rekombinant in *E. coli* exprimierten Fusionsproteine tragen C- und N-terminal sechs Histidinreste, die über Nickel-Ionen an die Nitrilotriacetic Säure (Ni-NTA) binden. Unter der Ni-NTA-Agarose ist zu verstehen, dass die Ni-NTA an die Sepharose Cl-6B gebunden ist. Die Bindung der His-Tag tragenden Fusionsproteine an die Ni-NTA-Agarose, die Reinigung sowie die Eluierung ist einfach und mit einem hohen Reinheitsgrad möglich.

Die aufgetauten Bakterienpellets wurden in 5ml Lysispuffer aufgenommen und einige Male kurz (5s) gevortext. Zur Dokumentation der Reinigungsmethode wurden 10µl der Bakteriensuspensionen in 10µl 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen und bei -20°C eingelagert. Anschließend wurde in die Polypropylensäulen 2x1ml Ni-NTA-Agarose eingefüllt. Danach wurden die Ni-NTA-Agarose-Säulen mit 5ml Aqua dest. gewaschen und mit 3ml Lysispuffer äquilibriert. Im folgenden Schritt fand die Zugabe der Bakteriensuspensionen auf die Säule statt. Jeweils 1ml der Durchflüsse mussten für die Dokumentation der Proteinreinigung aufgefangen werden. Davon wurden jeweils 10µl in 10µl 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen und bei -20°C eingelagert. Nachdem die Bakteriensuspensionen vollständig durchgetropft waren, wurden 2x4ml Waschpuffer auf die Säulen gegeben. Jeweils 1ml der Durchflüsse wurde zu Dokumentationszwecken von jedem

Waschschritt gesammelt. Davon wurden jeweils 10µl Probe abgenommen und mit 10µl 2x Probenpuffer bei -20°C eingelagert. Nach den Waschs chritten folgten drei Elutionschritte. Dazu wurde jeweils 1ml Elutionspuffer auf die Säulen gegeben. Die Durchflüsse der drei Elutionsschritte, die das gewünschte Fusionsprotein enthielten, wurden vollständig in 1,5ml Eppendorfgefäßen aufgefangen. Von jeder Elutionsprobe wurden erneut 10µl zu Dokumentationszwecken abgenommen und mit 10µl 2x Probenpuffer vermischt sowie bei -20°C gelagert.

Lysispuffer:	8M Harnstoff 1% Triton X100 50mM NaH ₂ PO ₄ 50mM Imidazol
Waschpuffer:	8M Harnstoff 50mM NaH ₂ PO ₄ 75mM Imidazol
Elutionspuffer:	8M Harnstoff 50mM NaH ₂ PO ₄ 400mM Imidazol
SDS-Probenpuffer (2x):	100mM Tris (pH 6.8) 24% Glycerol 8% SDS 2% β-Mercaptoethanol 0,02% Coomassieblue G-250

2.2.1.4 Analyse der exprimierten viralen Proteine

2.2.1.4.1 SDS-PAGE Gelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese ist eine analytische Methode, um die Proteine ihrer Größe nach im elektrischen Feld aufzutrennen. Durch die Zugabe von SDS (Sodiumdodecylsulfat) wird die Sekundärstruktur der Proteine zerstört und sie liegen in ihren Untereinheiten vor. Mit SDS maskierte Proteine sind alle negativ geladen und werden nach ihren Proteingrößen aufgetrennt. Die in SDS-Probenpuffer aufgenommenen Proteinproben wurden für 5min auf 95°C erhitzt. Während dieser Zeit mussten die 10%ige NuPAGE Novex Bis-Tris-Midi-Gele in die Midi-Gelapparatur eingespannt werden. Anschließend wurden die erhitzten

Proteinproben in die Geltaschen geladen. Danach erfolgte für 40min bei 200V die SDS-Gelelektrophorese.

2.2.1.4.2 Coomassie-Färbung:

Die Coomassie-Färbung dient zur Visualisierung der Proteinbanden in den Polyacrylamidgelen. Die Färbung der Polyacrylamidgele wurde mit SimplyBlue™ Safe Stain nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden die Polyacrylamidgele in eine mit Aqua dest. (Raumtemperatur = RT) gefüllte Schale überführt und in der Mikrowelle für ca. 1min erwärmt. Danach musste das Wasser abgegossen und neues Aqua dest. (RT) in die Schale mit dem Polyacrylamidgel gefüllt werden. Anschließend wurden die Polyacrylamidgele für 1min geschüttelt (Heidolph DUOMAX 1030 bei der Einstellung 5). Dann wurden diese erneut im Aqua dest. (RT) schwimmend in einer Mikrowelle für 1min erhitzt. Das Wasser musste erneut abgegossen und neues Aqua dest. (RT) in die Schale eingefüllt werden. Im Anschluss wurden die Polyacrylamidgele nochmals für 1min geschüttelt. Der beschriebene Ablauf musste ein weiteres mal wiederholt werden. Danach wurde das Wasser abgegossen und die Polyacrylamidgele mit SimplyBlue™ Safe Stain überdeckt sowie für 1min in der Mikrowelle erwärmt. Nachdem die Polyacrylamidgele für weitere ca. 5min bei Raumtemperatur gefärbt wurden, folgte für ca. 1½h die Entfärbung der Polyacrylamidgele in Aqua dest. (RT).

2.2.1.4.3 Westernblot

Der Westernblot ist eine Methode, um Proteine für weitere Nachweisverfahren auf eine Trägermembran zu übertragen. Die Nitrozellulosemembran Porablot NCP (Porenweite 0,45µm) und das Whatmanpapier wurden entsprechend der Gelgrößen zugeschnitten und für 1min im Transferpuffer äquilibriert. Anschließend wurden zwei Whatmanpapiere auf die untere Elektrode der „Semidry-Blotapparatur gelegt. Danach musste die Nitrozellulosemembran Porablot NCP auf die Filterpapiere gelegt werden. Im folgenden Schritt erfolgte die Öffnung der Polyacrylamidgalkassetten (Invitrogen) und das SDS-Gel wurde blasenfrei auf die Nitrozellulosemembran Porablot NCP aufgelegt. Die vom Gel unbedeckten Membranstücke wurden mit Parafilmstreifen abgedeckt. Danach wurden zwei Whatmanpapiere auf das Gel gelegt und mögliche Luftblasen durch rollende Bewegungen mit einer Glaspipette entfernt. Zum Schluss wurde die obere Elektrode aufgesetzt und eine Stromstärke von 1mA/cm² eingestellt. Nach 90min wurde der Proteintransfer beendet, der Blot abgebaut und die auf der Nitrozellulosemembran sichtbaren Proteinmarkerbanden mit einem Kugelschreiber nachgezeichnet.

Transfer Puffer:	48Mm Tris
	39mM Glycin
	0,037% SDS
	20% Methanol

2.2.1.4.4 Ponceau-Färbung

Die Beurteilung des Proteintransfers auf die Nitrozellulosemembran fand mit Hilfe der reversiblen Ponceau-Färbung statt. Die Nitrozellulosemembranen Porablot NCP wurden kurz im Aqua dest. (RT) gewaschen. Anschließend erfolgte für 1min mit 1x Ponceau-Rot-Lösung die Färbung der Nitrozellulosemembranen. Wenn die Proteinbanden sichtbar wurden, mussten die Nitrozellulosemembranen zur Entfärbung und Kontrastverstärkung der gefärbten Proteinbanden in Aqua dest. (RT) für einige Minuten geschwenkt werden.

Ponceau-Rot-Lösung 10x:	2g Ponceau-Pulver
	30g Sulfosalicylsäure
	30g Trichloressigsäure
	⇒ mit 100ml H ₂ O auffüllen

2.2.1.4.6 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Pierce BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Scientific)

Bicinchoninsäure (BCA) wird zur quantitativen Bestimmung von Proteinen verwendet. Die Proteinbindungen der Proteine reagieren mit dem zweiwertigen Kupferion zu einem Kupfer-Protein-Komplex. Die durch Reduktion entstandenen einwertigen Kupferionen erzeugen mit dem BCA eine violette Färbung (Komplexbildung), deren Absorption bei einer Wellenlänge von 562nm photometrisch gemessen werden kann.

Die Durchführung der Konzentrationsbestimmungen mit dem Pierce BCA™ Protein Assay Kit erfolgte nach Angaben des Herstellers (Thermo Scientific). Mit dem im Kit beigefügten BSA (Rinder-Serum-Albumin) wurde eine Verdünnungsreihe von 25-2000µg/ml erstellt. Das Verdünnen des BSAs erfolgte immer mit dem Puffer, in dem auch das zu untersuchende Protein gelöst vorliegt. Von jeder Verdünnungsstufe sowie von jeder zu messenden Proteinprobe wurden 50µl in ein neues 1,5ml Eppendorfgefäß überführt. Danach wurde das „Working Reagent“ in einem Verhältnis von 1:50 angesetzt. 50 Teile vom Reagenz A wurden mit 1 Teil vom Reagenz B gut gemischt. Anschließend musste 1ml der „Working Reagent“-Lösung jeweils mit den 50µl der Verdünnungsstufen sowie mit den 50µl der zu messenden Proteinprobe unter Vortexen gut vermischt werden. Nach einer Inkubationszeit von 30min bei

37°C erfolgte die Messung der Proteinproben bei einer Absorption von 562nm. Die Proteinproben wurden im Verhältnis zur BSA-Verdünnungsreihe ausgewertet.

2.2.2 Evaluierung der viralen Antigene im Mikroblot

Die viralen Antigene wurden nachdem bereits beschriebenen Westernblotverfahren auf parablott NCP Nitrozellulosemembran (Macherey-Nagel, Porengröße 0,45µm) geblottet und mit der Ponceau-Rotfärbung sichtbar gemacht. Anschließend wurden die Membranen mit den viralen Antigenen dem Kooperationspartner im Rahmen des BMBF-Projektes Bioresponse, der Firma Attomol zugesandt, die dann in einem patentierten Verfahren die Mikroblobs herstellte. Die fertigen Mikroblobs wurden zu Evaluierung zurückgesandt. Die Immunfärbung der Mikroblobs erfolgte nach einer Arbeitsanleitung und mit den Verbrauchsmaterialien der Firma Attomol GmbH, die unter Punkt 2.2.2.1 aufgeführt sind.

2.2.2.1 Probenvorbereitung

Die zu untersuchenden Serum- und Plasmaproben wurden auf Raumtemperatur erwärmt. Anschließend wurden sie für 10min bei 13000rpm mit der Biofuge-Zentrifuge (Heraeus) zentrifugiert, um unerwünschte Makromoleküle bzw. Lipide zu entfernen. Danach wurden die Serum- und Plasmaproben mit dem von der Firma Attomol GmbH mitgelieferten Probenpuffer in einem Verhältnis von 1:101 verdünnt. Neben dem Probenpuffer wurden der Waschpuffer und die Konjugatlösung bzw. die Substratlösung auf Raumtemperatur erwärmt und nach den Angaben des Herstellers verdünnt. Der Waschpuffer wurde mit Aqua dest. in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt. Die Konjugatlösung wurde dann kurz vor der Verwendung mit dem gebrauchsfertigen Waschpuffer in einem Verhältnis von 1:26 verdünnt.

2.2.2.2 Durchführung des Testverfahrens

100µl der verdünnten Serum- bzw. Plasmaproben wurden in die jeweiligen Plattenkavitäten mit den fixierten Mikroblobs gefüllt. Die befüllten Kavitäten wurden für 60min bei 500rpm und Raumtemperatur auf dem IKA-Schüttler MTS 2 geschüttelt. Danach wurden die Serum- bzw. Plasmaproben durch vorsichtiges Abgießen und anschließendes Abklopfen der Platte auf einem Filtertuch aus den Kavitäten entfernt. Anschließend mussten die Mikroblobs 3mal mit jeweils 200µl Waschpuffer gewaschen werden. Dazu wurden die Kavitäten mit dem Waschpuffer befüllt und für 5min bei 900rpm und Raumtemperatur auf dem IKA-Schüttler MTS 2 geschüttelt. Im folgenden Schritt wurden 100µl des gebrauchsfertigen Konjugats in die Kavitäten gefüllt. Nachdem die Platte mit den Mikroblobs für 60min bei 500rpm und Raumtemperatur auf dem IKA-Schüttler MTS 2 geschüttelt hatte, wurden die

Konjugatlösungen durch Abgießen und anschließendes Abklopfen der Platte auf einem Filtertuch entfernt. Dann mussten die Mikroblobs erneut 3mal mit jeweils 200µl Waschpuffer wie beschrieben gewaschen werden. Im Anschluss wurden 100µl der Substratlösung in die Kavitäten gefüllt, die Platte mit Alufolie verdunkelt und für 30min bei Raumtemperatur und 500rpm auf dem IKA-Schüttler geschüttelt. Danach wurde die Substratlösung durch abgießen und abklopfen aus den Kavitäten entfernt und die Mikroblobs nochmals mit 200µl Waschpuffer gewaschen. Dazu wurde die Platte erneut für 5min bei 900rpm und Raumtemperatur auf dem IKA-Schüttler MTS 2 geschüttelt. Anschließend wurden die Mikroblobs für 5min mit 200µl Aqua dest. bei 900rpm und RT auf dem IKA-Schüttler MTS 2 gewaschen. Am Schluss wurde das Wasser abgegossen und alle Flüssigkeitsreste durch Abklopfen auf Filterpapier entfernt.

2.2.2.3 Detektion

Über Nacht wurde die Mikroblobplatte bei RT getrocknet und nach 16h für die Auswertung eingescannt. Die Auswertung erfolgte mit dem Microblob-Analyzer, einer von der Attomol GmbH zur Verfügung gestellten Software.

2.2.3 Vergleichsanalysen

2.2.3.1 Human Herpesvirus 6 IgG ELISA (Panbio, Russelheim)

2.2.3.1.1 Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung und die Durchführung des Tests erfolgten nach den Angaben des Herstellers. Die zu untersuchenden Serumproben wurden auf Raumtemperatur erwärmt und anschließend mit dem Probenpuffer in einem Verhältnis von 1:101 verdünnt. Neben dem Probenpuffer wurden der Waschpuffer und die Konjugatlösung bzw. die Substratlösung auf Raumtemperatur erwärmt und nach den Angaben des Herstellers verdünnt. Der Waschpuffer wurde in einem Verhältnis von 1:20 mit Aqua dest. verdünnt.

2.2.3.1.2 Durchführung des Testverfahrens

100µl der verdünnten Serumprobe, der Kontrollen und Kalibrationsseren wurden in die jeweiligen Kavitäten gefüllt. Die abgedeckten Platten mussten anschließend für 30min bei 37°C inkubiert werden. Danach wurden die Kavitäten 6mal mit 300µl gebrauchsfertigem Waschpuffer gewaschen. Im folgenden Schritt wurde 100µl der Konjugatlösung (mit Meerrettichperoxidase konjugiertes Anti-Human IgG) in die jeweiligen Kavitäten gefüllt. Die

abgedeckten Platten mussten dann erneut für 30min bei 37°C inkubiert und anschließend erneut 6mal mit 300µl pro Kavität gebrauchsfertigem Waschpuffer gewaschen werden. Danach wurde 100µl TMB (Tetramethylbenzidin) in jede Kavität pipettiert. Die Platten mussten dann für 10min bei Raumtemperatur inkubiert werden. Im letzten Schritt wurde 100µl Stopplösung in die jeweiligen Kavitäten gefüllt.

2.2.3.1.3 Detektion

Nach 5-10min wurde die Platte bei einer Wellenlänge von 450nm und einem Referenzfilter von 600 bis 650nm gemessen.

2.2.3.2 recomBlot CMV IgG (Mikrogen, Neuried)

2.2.3.2.1 Probenvorbereitung

Die Probenaufbereitung und die Durchführung des Testes erfolgten nach den Angaben des Herstellers. Die zu untersuchenden Serum- und Plasmaproben wurden auf Raumtemperatur erwärmt. Neben dem Probenpuffer wurden der Waschpuffer und die Konjugatlösung bzw. die Substratlösung auf Raumtemperatur erwärmt und nach den Angaben des Herstellers verdünnt. Der Waschpuffer wurde mit dem vom Hersteller mitgelieferten Magermilchpulver versetzt und anschließend in einem Verhältnis von 1:10 mit Aqua dest. verdünnt. Die Konjugatlösung wurde dann kurz vor der Verwendung mit dem gebrauchsfertigen Waschpuffer in einem Verhältnis von 1:100 verdünnt.

2.2.3.2.2 Durchführung des Testverfahrens

In die Vertiefungen einer Inkubationsschale wurden die Teststreifen eingelegt und 2ml des gebrauchsfertigen Waschpuffers in die Vertiefungen mit den Teststreifen pipettiert. 20µl der Serumprobe oder Kontrollproben wurden jeweils zu den Inkubationsansätzen dazu pipettiert. Die Teststreifen mussten dann 1h in der Serumverdünnung auf einem Kippschüttler inkubiert werden. Nach der Inkubation wurden die Teststreifen 3mal mit 2ml gebrauchsfertigem Waschpuffer für 5min auf einem Kippschüttler gewaschen. Anschließend wurde 2ml der Konjugatlösung zu den Teststreifen gegeben und diese für 45min inkubiert. Im folgenden Schritt mussten die Teststreifen erneut 3mal mit 2ml gebrauchsfertigem Waschpuffer für 5min auf einem Kippschüttler gewaschen werden. Anschließend wurde zu den Teststreifen 1,5ml Substratlösung pipettiert und diese für 5-10min unter Schütteln inkubiert. Danach wurde die Substratlösung abgekippt und die Teststreifen 3mal mit Aqua dest. kurz gewaschen. Zum Schluss mussten die Teststreifen trocknen und wurden dann eingescannt.

2.3 Patientenproben

Die verwendeten Seren, Plasmen und Liquores wurden vom Institut für Virologie der Medizinischen Fakultät an der Technischen Universität Dresden zur Verfügung gestellt. 30 Thrombozytenspender (mind. 18 Jahre, max. 48 Jahre) mit einem Durchschnittsalter von 31,7 Jahre und 30 Eigenblutspender (mind. 19 Jahre, max. 81 Jahre) mit einem Durchschnittsalter von 49,7 Jahren bildeten den Pool der Erwachsenenserum. Weiterhin wurden zur Evaluierung des HHV6-Mikroblots 29 Kinderseren getestet. Die Kinder waren im Durchschnitt 6,9 Jahre alt (mind. 2 Monate, max. 18 Jahre). Der HCMV- und HHV6-Serologiestatus der Erwachsenenserum wurde in der Routinediagnostik des Institutes für Virologie mittels Enzygnost* Anti-CMV-IgG Testsystem (Dade Behring, Marburg) sowie HHV6-IgG-IFT (Euroimmun, Lübeck) ermittelt und war als Ausgangswert bekannt. Weitere 30 serologisch HCMV-grenzwertige Seren dienten der Spezifitätstestung der serologischen HCMV-Testsysteme. Das Durchschnittsalter dieser Patienten lag bei 39,5 Jahren (min. 16 Jahre max. 76 Jahre). Für die technische Evaluierung des Mikroblotsystems wurden insgesamt 89 bzw. 90 Seren mit bekannten serologischen Status verwendet.

Weiterhin wurden die Seren und Plasmen von 25 Blutstammzellempfängern mit unterschiedlichen malignen Grunderkrankungen des hämatopoetischen Systems ebenfalls vom Institut für Virologie der Medizinischen Fakultät an der Technischen Universität Dresden zur Verfügung gestellt. Mit dem HCMV-Mikroblot wurden die Seren und Plasmen von 22 der 25 Blutstammzellempfänger mit einem Durchschnittsalter von 54,2 Jahren (mind. 37 Jahre, max. 71 Jahre) getestet. Mit dem HHV6-Mikroblot wurden die Seren und Plasmen von 17 der 25 Patienten mit einem Durchschnittsalter von 50,6 Jahren (mind. 30 Jahre, max 71 Jahre) getestet.

2.4 Statistische Methoden

Statistische Analysen wurden mit dem Statistikprogramm SPSS 15.0 bzw. 16.0 durchgeführt. Im ersten Schritt wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test geprüft, ob die Datenmengen von der Normalverteilung abweichen. Mit dem Kruskal-Wallis-Test wurde untersucht, ob die nicht normalverteilten unabhängigen Datenmengen sich signifikant unterscheiden. Wenn signifikante Unterschiede zwischen den Datenmengen festgestellt wurden, erfolgte anschließend mit dem Nemenyi-Test der multiple Vergleich zwischen den Datenmengen. Abhängig von der Anzahl der experimentell untersuchten Faktoren wurden zur Überprüfung auf signifikante Unterschiede einfaktorielle und zweifaktorielle Varianzanalysen verwendet. Die Prüfung, ob zwei unabhängige normalverteilte Datenmengen sich signifikant unterscheiden, erfolgte mit der t-Test-Analyse. Bei allen statistischen Testsystemen wurde ein Signifikanzniveau von $p=0,05$ angenommen.

3. Ergebnisse

3.1 Expression der HCMV- und HHV6-Antigene

3.1.1 Auswahl der Zielsequenzen

Von beschriebenen antigenen Strukturproteinen und Nichtstrukturproteinen der Betaherpesviren wurden Proteinbereiche mit und ohne bekannten Epitopen ausgewählt und als Fusionsproteine in BL-21 Zellen exprimiert. Ripalti et. al. (1994) zeigten, dass exprimierte Fusionsantigene mit einem oder mehreren linearen Epitopen als diagnostischer Marker zum Nachweis von HCMV-Virusinfektionen dienen können [98]. In der Tabelle 12 sind alle exprimierten und im Mikrobrot getesteten Fusionsproteine bzw. -antigene der Betaherpesviren mit den entsprechenden Proteinsequenzen der Virusproteine sowie deren Bezeichnungen zusammengefasst. Die ausgewählten Proteinbereiche der HCMV-Fusionsantigene für den HCMV-IgG-Mikrobrot umfassen z.B. die beschriebenen Antigenomane AD1 (aa552-635) und AD3 (aa783 an 906) des HCMV-Glykoproteins B [99, 100] oder die von Takahashi et al. (2002) beschriebene Epitopregion aa595-652 des antigen bekannten HCMV-Tegumentproteins pp150 [101, 102]. Weiterhin wurden Proteinbereiche von dem als antigen beschriebenen Strukturprotein pp28 sowie dem Nichtstrukturprotein pp52 [103] für die Herstellung der HCMV-Fusionsantigene ausgewählt. Da das Polymerase assoziierte pp52-Protein sowie das Tegumentprotein pp150 als Antigene für frühe IgM-Antikörper der HCMV-Infektion beschrieben wurden [103] und das Tegumentprotein pp28 sowie das Glykoprotein B hingegen als wichtige Antigene für den Nachweis einer späten IgG-Antikörperantwort beschrieben wurden [103], stellten diese Proteine einen wichtigen Pool bei der Auswahl von Proteinbereichen für die Entwicklung der Fusionsantigene dar. Obwohl das in der Antigendiagnostik bekannte Tegumentprotein pp65 nur eine geringe Antikörperantwort induziert [104, 105], wurden Proteinbereiche des pp65-Proteins für die Herstellung von Fusionsantigenen ausgewählt. Auf Grund der guten antigenen Eigenschaften wurden für die Expression der HHV6-Fusionsantigene für den HHV6-IgG-Mikrobrot Proteinbereiche des Tegumentproteins pp 100 [106, 107] und des Glykoproteins B [108] ausgewählt. Für die serologische Unterscheidung der Subtypen HHV6 A und HHV6 B wurden zur Herstellung von HHV6-Fusionsantigenen vom Tegumentprotein pp100, vom Glykoprotein B [108] sowie vom Glykoprotein U47 [109] Subtyp-spezifische Proteinbereiche gewählt. Die Proteinsequenz des Glykoproteins L stellte eine weitere Quelle für die Herstellung eines Fusionsantigens für den HHV6-Mikrobrot dar.

Tabelle 12: Zusammenfassung der viralen Fusionsantigene

In Tabelle 12 sind die viralen Fusionsantigene mit den Proteinsequenzen der entsprechenden Virusproteine zusammengefasst.

F1,2,3 = Fragmente 1,2,3

Bezeichnung des Antigens	Virus	Protein	Bezeichnung des Virusproteins	Sequenzbereich	Proteinbereich
HCMV gB-F2	HCMV	Glykoprotein B	Glykoprotein	aa532-653	C-terminal
HCMV gB-F3	HCMV	Glykoprotein B	Glykoprotein	aa779-907	C-terminal
HCMV pp150-F1	HCMV	pp150	Tegumentprotein	aa5-402	N-terminal
HCMV pp150-F2	HCMV	pp150	Tegumentprotein	aa414-551	C-terminal
HCMV pp150-F3	HCMV	pp150	Tegumentprotein	aa491-698	C-terminal
HCMV pp65-F1	HCMV	pp65	Tegumentprotein	aa9-183	N-terminal
HCMV pp65-F2	HCMV	pp65	Tegumentprotein	aa174-376	N-terminal
HCMV pp28-F1	HCMV	pp28	Tegumentprotein	aa15-51	N-terminal
HCMV pp28-F2	HCMV	pp28	Tegumentprotein	aa129-166	C-terminal
HCMV pp52-F1	HCMV	pp52	Tegumentprotein	aa266-293	C-terminal
HHV6 A gL	HHV6	Glykoprotein L	Glykoprotein	aa12-242	
HHV6 A pp100-F1	HHV6 A	pp100	Tegumentprotein	aa295-576	N-terminal
HHV6 A pp100-F2	HHV6 A	pp100	Tegumentprotein	aa569-852	C-terminal
HHV6 B pp100-F1	HHV6 B	pp100	Tegumentprotein	aa281-614	N-terminal
HHV6 B pp100-F2	HHV6 B	pp100	Tegumentprotein	aa601-839	C-terminal
HHV6 A U47-F2	HHV6 A	U47	Membran sekretiertes Glykoprotein	aa341-650	C-terminal
HHV6 B U47-F2	HHV6 B	U47	Membran sekretiertes Glykoprotein	aa321-727	C-terminal
HHV6 B U47-F6	HHV6 B	U47	Membran sekretiertes Glykoprotein	aa542-644	C-terminal
HHV6 A gB-F1	HHV6 A	Glykoprotein B	Glykoprotein	aa 335-395	N-terminal
HHV6 B gB-F1	HHV6 B	Glykoprotein B	Glykoprotein	aa335-395	N-terminal

3.1.2 Klonierung der Zielsequenzen in den Expressionsvektor pet 28a (+)

Zur Herstellung der HHV6- und HCMV-Fusionsantigene wurden mittels Nested-PCR die ausgewählten DNA-Sequenzen amplifiziert und in den pCR II-TOPO-Vektor (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen) kloniert. Der Nachweis einer erfolgreichen nested PCR erfolgte durch die Dokumentation der DNA-Banden in entsprechender Höhe im Gelbild (Abb. 3). Der Erfolg der TOPO-TA-Klonierung sowie der Erfolg der Transformation der pCRII-TOPO Vektoren in die kompetenten TOP 10 *E. coli* Zellen wurde neben der Antibiotikaselektion auf den Agarplatten durch den sich anschließenden Restriktionsverdau mit EcoR1 und Not1 (Abb. 4) sowie der DNA-Sequenzierung nachgewiesen. Die mittels Vector NTI Advance 10 geprüften

und richtigen DNA-Sequenzen wurden aus dem pCRII-TOPO-Vektor mit den Enzymen EcoRI und NotI geschnitten und in das Expressionsplasmid (pet 28a (+); Invitrogen) kloniert. Der Nachweis der erfolgreichen Klonierung und Transformation in BL21-Zellen erfolgte erneut neben der Antibiotikaselektion auf den Agarplatten mittels Restriktionsverdau mit EcoRI und NotI (Abb. 5) sowie DNA-Sequenzierung.

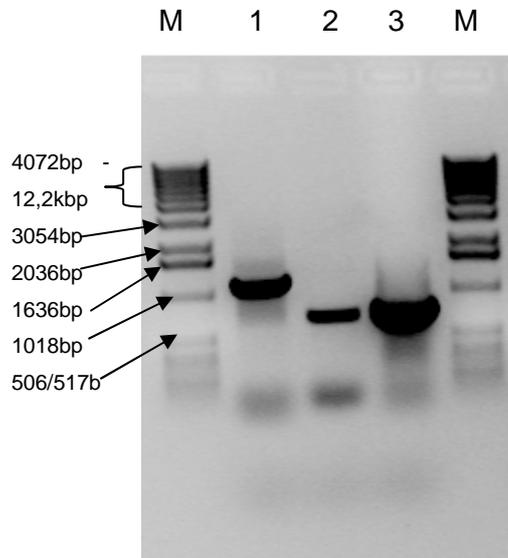


Abb. 3 Nachweis der erfolgreichen nested-PCR

In der Abbildung 3 ist eine erfolgreiche nested PCR am Beispiel des PCR-Fragmentes HHV6 A gL (707 bp) gezeigt. In der Gelbahn 2 ist eine DNA-Bande des PCR-Fragmentes HHV6 A gL (707bp) zu sehen. In den Gelbahnen 1 und 3 sind weitere PCR-Banden von anderen PCR-Fragmenten zu erkennen, die in den folgenden Ergebnissen jedoch nicht erscheinen.

g = Glykoprotein

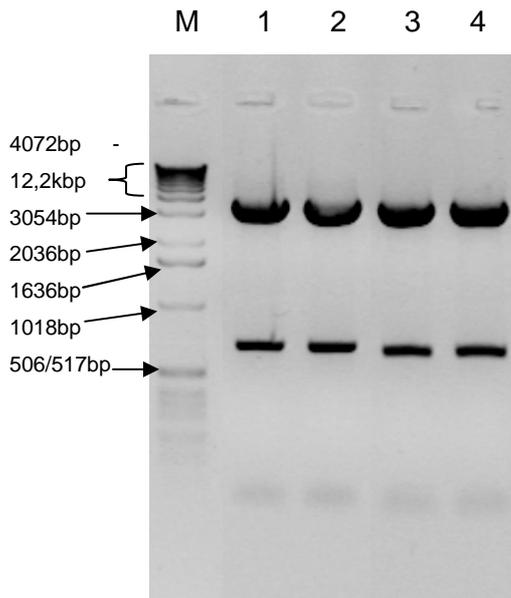


Abb. 4: Nachweis der erfolgreichen TOPO-TA-Klonierung

Die Abbildung 4 zeigt am Beispiel des DNA-Fragmentes HHV6 A gL (707bp) vier mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *NotI* erfolgreiche Restriktionsverdaue der pCR II-TOPO-Plasmide, die auf eine erfolgreiche TOPO-TA-Klonierung hinweisen.

g = Glykoprotein

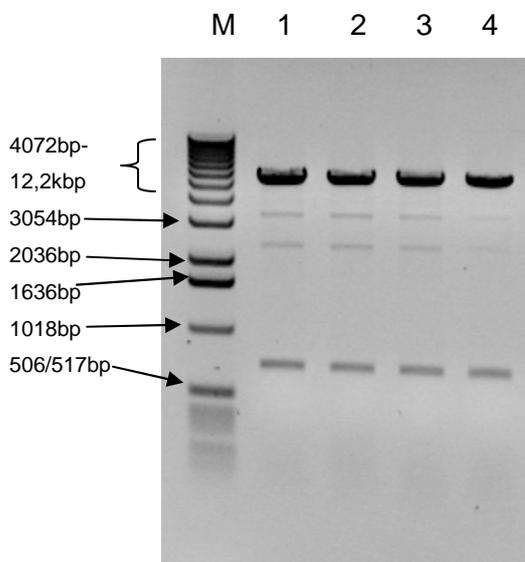


Abb. 5: Nachweis der erfolgreichen Umklonierung in das Expressionsplasmid

Die Abbildung 5 zeigt am Beispiel des DNA-Fragmentes HHV6 A gL (707bp) vier mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *NotI* erfolgreiche Restriktionsverdaue der Expressionsplasmide, die auf eine erfolgreiche Klonierung der Zielsequenz HHV6 gL in das Expressionsplasmid (*pet 28a (+)*, 5443bp) hinweisen.

g = Glykoprotein

3.1.3 Aufreinigung der Fusionsantigene

Die heterologe Proteinexpression der viralen Fusionsantigene wurde durch Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) am Lactose-Operon induziert. Der pet 28a (+)-Expressionsvektor trägt das bekannte Bakteriophagen T7 Promotorsystem, welches durch die lac-Gene reguliert und durch IPTG induziert wird. Nach der Ernte der Bakterienzellen und dem Aufschluss der BL21-Zellen wurden die viralen Fusionsantigene durch die N- und C-terminalen Poly-His-Tags (6 Histidinreste C- und N-terminal) über eine Ni-NTA-Agarose-Säule (Qiagen) aufgereinigt. Die Fusionsproteine binden mittels der Histidinreste über die Nickelionen an die Nitrilotriacetic Säure (Ni-NTA) NTA. Der His-Tag zählt mit 6 C- und 6 N-terminal liegenden Histidinresten zu den kleinen Tags und wirkt nur wenig antigen. Der His-Tag musste daher nicht mit einer Protease abgespalten werden. Zur Dokumentation der erfolgreichen Expression und Aufreinigung wurden die vor und nach der Induktion mit IPTG sowie während der Reinigungsschritte über die Ni-NTA-Agarose-Säule gesammelten Proteinproben mittels SDS-Page-Gelelektrophorese und sich anschließender Coomassieblau-Färbung sichtbar gemacht. Beispielhaft für den Expressions- und Aufreinigungserfolg vieler Fusionsantigene ist in der Abb. 6 die Aufreinigung des Fusionsantigens HHV6 gL dargestellt. Die mittels IPTG induzierte Expression des Fusionsproteins bzw. -antigens HHV6 gL ist im Coomassie-Bild durch eine Proteinbande in Höhe von 32kDa sichtbar. Die kräftige Bande verweist auf eine sehr gute Proteinexpression. Andere hier nicht gezeigte Fusionsproteine wurden schwach oder gar nicht exprimiert. In der Abb. 6 wird deutlich, dass neben vielen Bakterienproteinen in der Durchflussfraktion auch ein Anteil des Fusionsproteins zu finden war. Durch die Waschschrte wurde der Hauptanteil an nicht gebundenen Bakterienproteinen von der Säule gespült. Wie das Gelbild zeigt, wies das eluierte Fusionsantigen HHV6 gL eine Reinheit von ca. 80% auf. Die Reinheit der anderen HCMV- und HHV6- Antigene schwankte zwischen 60 und 95%.

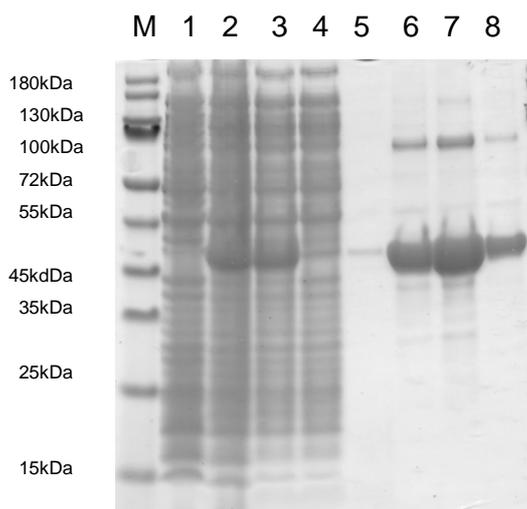


Abb. 6: Nachweis der erfolgreichen Expression und Aufreinigung der Fusionsantigene

Die Abbildung 6 zeigt die erfolgreiche Expression und Aufreinigung des Fusionsantigens HHV6 gL (32kDa) durch das Auftreten einer Proteinbande in erwarteter Höhe in Bahn 2. Vor der Induktion ist in der Bahn 1 nur eine sehr schwache Bande in entsprechender Höhe zu vermuten. Die Bahn 3 bis Bahn 8 zeigt die Aufreinigungsschritte des Fusionsantigens HHV6 gL. In der Bahn 3 sind die Bakterienproteine zu sehen, die nicht an die Ni-NTA-Agarose-Säule gebunden haben und daher in den Durchfluss gelangt sind. Die von der Ni-NTA-Agarose-Säule durch die Waschschrte 1 und 2 gewaschenen Bakterienproteine sind in den Bahnen 4 und 5 dokumentiert. Die Bahnen 6 bis 8 zeigen das eluierte Fusionsantigen HHV6 gL (32kDa) in einer Reinheit von ca. 80%.

g = Glykoprotein

Tabelle 13: Zusammenfassung der Probenaufteilung in der Abb. 6

Bahnnummer	Erläuterungen
M	Marker
1	lysiertes Bakterienpellet vor der Induktion
2	lysiertes Bakterienpellet 4h nach der Induktion
3	Durchfluss
4	Waschschritt 1
5	Waschschritt 2
6	Eluat 1
7	Eluat 2
8	Eluat 3

3.2 Evaluierung der Virusantigene im MikrobLOT

Der MikrobLOT, eine miniaturisierte Form der Westernblot- bzw. der Streifenresttechnologie, ermöglicht die Bestimmung von bis zu zehn Parametern in einer Kavität einer 96-Well-Mikrotiterplatte. Im Rahmen des BMBF-Projektes Bioresponse wurde die MikrobLOT-Technologie vom Netzwerkpartner der Firma Attomol GmbH zur Verfügung gestellt. Zur Herstellung der MikrobLOTS wurden pro Antigen 7µg eingesetzt. Bei einer Taschenbreite von 7mm entspricht das einer Konzentration von 1µg Antigen pro 1mm. Für die Herstellung der HCMV-MikrobLOTS sowie der HHV6-MikrobLOTS wurden jeweils zehn HCMV- oder zehn HHV6-Fusionsantigene auf die Nitrozellulosemembran Porablot NCP routinemäßig geblottet (Abb. 7) und anschließend diese Membran der Firma Attomol GmbH zugesandt. Der Kooperationspartner, die Firma Attomol GmbH stellte aus den zehn Antigenen MikrobLOTS her (Abb. 8). Die fertigen MikrobLOTS wurden zur Testung der Antigene (Fusionsantigene) auf ihre Funktionalität und Antigenspezifität mittels humaner Seren bzw. Plasmen von der Firma Attomol GmbH zurückgesandt. Die Durchführung der Immunreaktion in den MikrobLOTS erfolgte wie unter Punkt 2.2.2.1 aufgeführt. Für die Auswertung der MikrobLOTS stellte der Kooperationspartner eine Software (MikrobLOT-Analyzer) zur Verfügung. Für die verwendeten Seren wurde zuvor in der Routinelabordiagnostik mit einem etablierten und CE zertifizierten Anti-HHV6-IgG-Immunfluoreszenztest der Firma Euroimmun (Lübeck) sowie einem Enzygnost* Anti-CMV-IgG Testsystem der Firma Dade Behring (Marburg) der Antikörperstatus bestimmt. Es wurde ausschließlich der IgG-Antikörperstatus ermittelt.

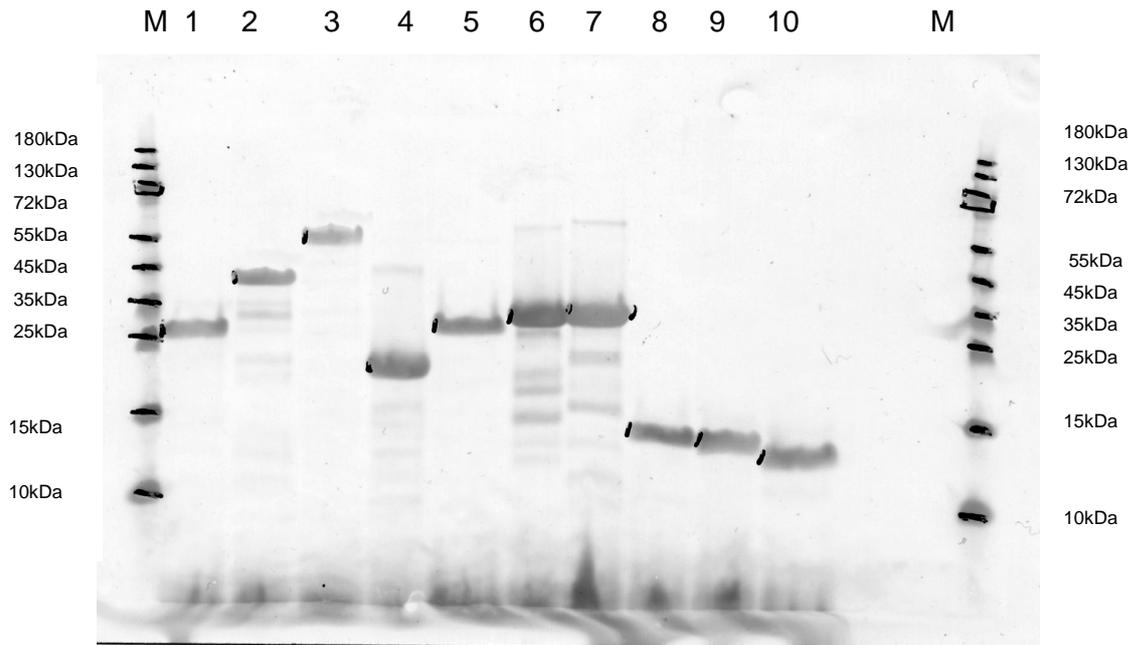


Abb. 7: geblottete und mit Ponceaurot gefärbte HCMV-Antigene

Die Abbildung 7 zeigt eine Nitrozellulosemembran der zehn aufgereinigten und erfolgreich geblotteten HCMV-Fusionsantigene ($1\mu\text{g}/1\text{mm}$). Die Fusionsantigene wurden durch die Ponceaurot-Färbung sichtbar gemacht.

Tabelle 14: Zusammenfassung der Probenaufteilung in der Abb. 7

Bahnnummer	Protein	Größe
1	HCMV-pp150-F1	20kDa
2	HCMV-pp150-F2	28kDa
3	HCMV-pp150-F3	34kDa
4	HCMV-gB-F2	19kDa
5	HCMV-gB-F3	20kDa
6	HCMV-pp65-F1	25kDa
7	HCMV-pp65-F2	29kDa
8	HCMV-pp28-F1	10kDa
9	HCMV-pp28-F2	10kDa
10	HCVm-pp52-F1	9kDa

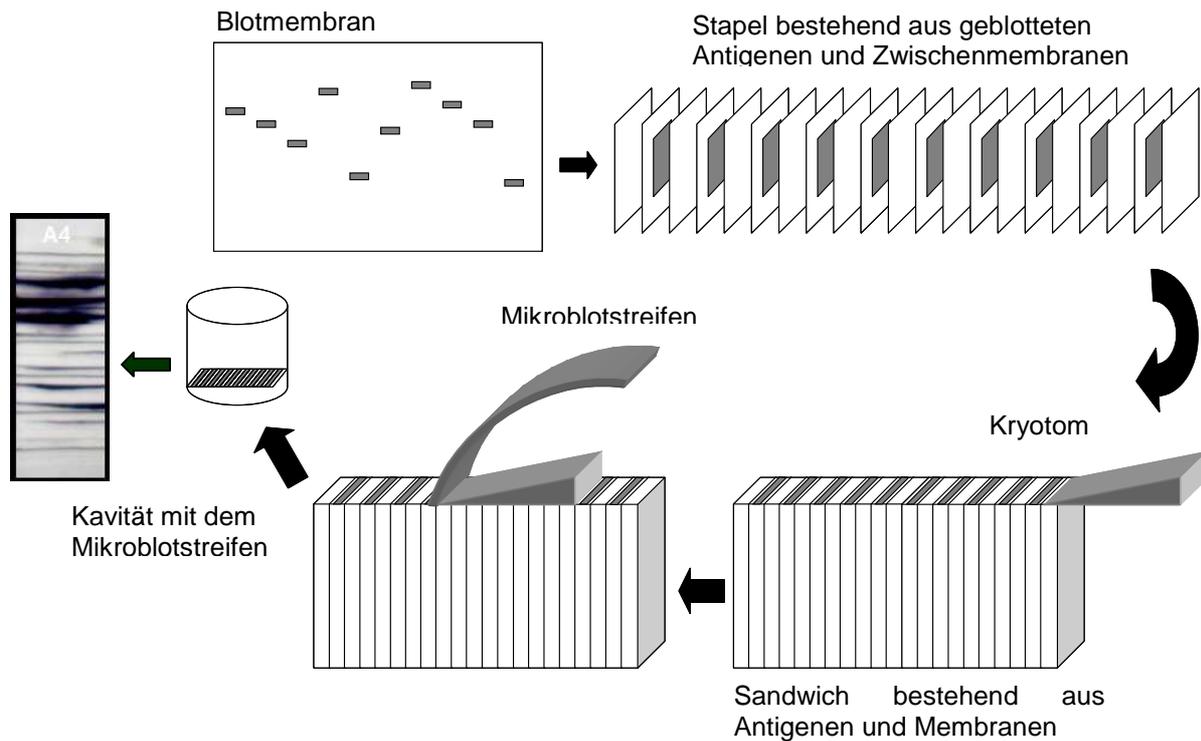


Abb. 8 : Herstellung der Mikrobloods

In der Abbildung 8 ist skizzenhaft die Herstellung der Mikrobloods gezeigt. Die Fusionsantigene wurden auf einer Membran geblottet und der Firma Attomol zugeschickt. Die durch die Ponceaurot-Färbung sichtbar gemachten Fusionsantigene wurden ausgeschnitten und mit Zwischenmembranen gestapelt. Der Stapel bestehend aus den geblotteten Antigenen und Zwischenmembranen wurde in einem Mikrotom hochkant eingespannt und geschnitten. Die fertigen Mikrobloodstreifen wurden auf in den Kavitäten fixierten Plastikstegen als Träger aufgebracht, wobei die Mikrobloodstreifen in Richtung der Plattenböden ausgerichtet sind.

Tabelle 15: Zusammenfassung der im Mikrobloblot getesteten HCMV- bzw. HHV6-Antigene

Die Tabelle 15 zeigt die im Mikrobloblot getesteten HCMV-bzw. HHV6-Antigene in der Anordnung, wie sie auch im Mikrobloblot zu finden waren.

Bande	HCMV-Mikrobloblot	HHV6-Mikrobloblot
Markerbande	x	x
Referenzbande	Immunglobulin G	Immunglobulin G
Markerbande	x	x
Antigen 1	HCMV pp150-F1	HHV6 A gB-F1
Antigen 2	HCMV pp150-F2	HHV6 B gB-F1
Markerbande	x	x
Antigen 3	HCMV pp150-F3	HHV6 A U47-F2
Antigen 4	HCMV gB-F2	HHV6 B U47-F2
Markerbande	x	x
Antigen 5	HCMV gB-F3	HHV6 A pp100-F1
Antigen 6	HCMV pp65-F1	HHV6 A pp100-F2
Markerbande	x	x
Antigen 7	HCMV pp65-F2	HHV6 B pp100-F1
Antigen 8	HCMV pp28-F1	HHV6 B pp100-F2
Markerbande	x	x
Antigen 9	HCMV pp28-F2	HHV6 A gL
Antigen 10	HCMV pp52-F1	HHV6 B U47-F6
Markerbande	x	x

3.2.1 Auswertung der Mikrobloblotdaten

Die Bindung der Antikörper aus den zu untersuchenden Seren und Plasmen an die spezifischen Antigene (Fusionsantigene) wurde durch eine auf Peroxidase und Tetramethylbenzidin (TMB) basierende indirekte Immunfärbung sichtbar gemacht, wobei das Chromogen Tetramethylbenzidin (TMB) nach der Oxidation als unlöslicher blauer Farbstoff am Ort der Reaktion ausfiel. Die Auswertung der gefärbten Antigenbanden in den Mikrobloblots erfolgte durch eine von Attomol zur Verfügung gestellte und sich in der Entwicklung befindende Software (Mikrobloblot Analyzer). Diese transformierte das gescannte Bild der Antigenbanden in ein Schwarz-Weiß-Bild und ermittelte auf Grund der Farbdichte einen densitometrischen Wert der Antigenbande. Der ermittelte densitometrische Wert wurde dann in Relation zum mittleren Grauwert der Hintergrundabgleichsfelder des entsprechenden Mikrobloblots gesetzt. Die ermittelten digitalen Werte lagen zwischen 0 und 680 relativer Bandenintensität und stellen ein Maß für die quantitative Farbdichte bzw. gebildete

Farbmenge der Antigenbande dar, wobei die Farbmenge mit der Enzymdichte und damit indirekt mit der gebundenen Antikörpermenge relativ korreliert. Ein digitaler Wert von 0 zeigt an, dass keine Farbreaktion zu messen ist. Steigende digitale Werte zeigen eine quantitative Zunahme der Farbdichte an. Die Auswahl des Bandenbereiches zur Ermittlung der digitalen Werte erfolgt mit Hilfe einer Programmmaske. Die Software platziert die Bandenmessfelder anhand von Markerbanden auf dem Mikrobplot. Da die Antigenbanden jedoch nicht immer in der gleichen Höhe zu finden waren, entsprachen die durch die Programmmaske definierten Bandenmessfelder nicht immer den realen Antigenbereichen. Die ermittelten digitalen Werte waren in solchen Fällen falsch. Zum Beispiel wurden mit der Software für einige sehr stark gefärbte Antigenbanden, die nur teilweise oder nicht in den Bandenmessfeldern lagen, digitale Werte von 0 bis 55 ermittelt. Wenn eine gesamte Antigenbande bei sehr starker Färbung im Bandenmessfeld lag, wurden digitale Werte mit einem im Mittel geschätzten Wert von 350 relativer Bandenintensität berechnet. Eine manuelle Verschiebung der Programmmaske wurde durch die Softwareentwickler nicht vorgesehen. Weiterhin kam es bei einigen Mikrobplots methodenbedingt zu unspezifischen Hintergrundfärbungen, die auf Grund der verstärkten Farbdichte im Bereich der Antigenbanden zu falsch-positiven Ergebnissen führten. Im Diagramm 1 ist die Häufigkeitsverteilung der ermittelten digitalen Werte von 556 Antigenbanden dargestellt, die mit dem Auge keine erkennbare Farbreaktion aufwiesen. Das ist der Fall, wenn der Bandenbereich weiss bzw. keine farbliche Abrenzung zum Hintergrund des Mikrobplots erkennbar war. 75,7% der Daten wiesen den digitalen Wert von 0 auf (keine Farbreaktion). 24,3% der 556 untersuchten Daten wiesen digitale Werte größer als 0 auf. Der größte gemessene digitale Wert einer visuell als negativ beurteilten Bandenreaktion lag bei 103 relativer Einheit. Normalerweise würde das Programm einen solchen Wert eindeutig als positive Reaktion beurteilen und das Serum als positiv einstufen. Auf Grund von algorithmischen Entscheidungen der Software wurden weitere ca. 20% der Mikrobplots nicht ausgewertet. Um eine Auswertung der Daten trotz methodischer Probleme und Softwareprobleme zu realisieren, wurde eine semiquantitative Auswertung der Bandenfärbung durchgeführt. Für die Auswertung der Mikrobplotdaten wurde auf Grundlage der Bandenfärbung der visuelle Färbungsgrad von 1-4 definiert (Tabelle 16).

Histogramm

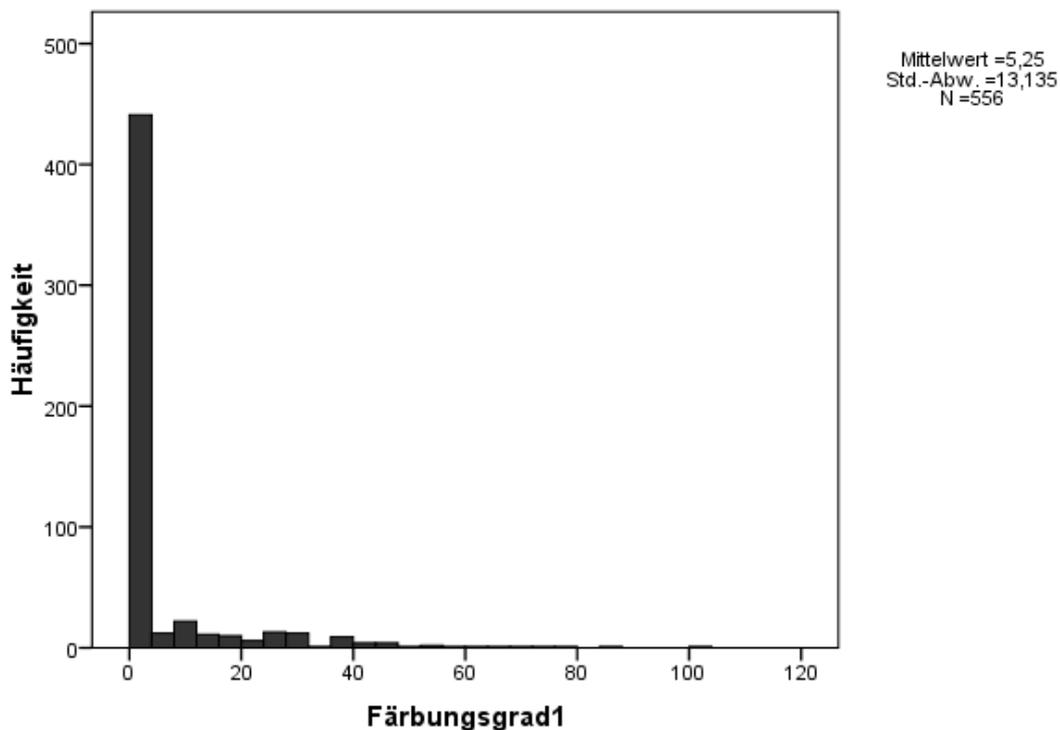


Diagramm 1: Häufigkeitsverteilung der mit dem Färbungsgrad 1 beurteilten digitalen Daten, n= 556

Im Diagramm 1 sind die ermittelten digitalen Werte von 556 Antigenbanden, die gemessen durch das Auge keine Bandenfärbung aufwiesen, in einem Histogramm graphisch dargestellt. 75,5% der dem Färbungsgrad 1 zugeordneten digitalen Daten wiesen den digitalen Wert von 0 auf (keine Farbreaktion). 24,3% der digitalen Daten wiesen digitale Werte größer als 0 auf.

Tabelle 16: Definition des visuellen Färbungsgrades

Färbungsgrad	Bandenfärbung	Bedeutung
1	keine Bandenfärbung	keine Antigen-Antikörperreaktion
2	sehr schwache Bandenfärbung, mit dem Auge eine gerade noch wahrnehmbare Bandenfärbung	sehr schwache Reaktion (grenzwertig), stellt den cut off-Punkt der Methode dar, ab diesem Punkt wird die Antigen-Antikörperreaktion als positiv bewertet
3	deutliche Bandenfärbung	positive Antigen-Antikörperreaktion
4	sehr starke Bandenfärbung, Färbung bis schwarz erscheinend	sehr gute Antigen-Antikörperreaktion

Der Färbungsgrad 1 wurde festgestellt, wenn keine Färbung der Antigenbande sichtbar war und somit keine Antigen-Antikörperbindung stattgefunden hat. Antigenbanden, die sehr schwach gefärbt waren, wobei die Färbung mit dem Auge gerade noch wahrnehmbar war, wurden als Färbungsgrad 2 definiert. Der Färbungsgrad 2 stellt den cut off-Punkt der Methode dar. Er definiert, ab wann eine Bandenfärbung als Indikator für die Antigen-Antikörperreaktion als positiv definiert wird. Der Färbungsgrad 2 wurde in der Auswertung als grenzwertig betrachtet. Die Färbungsgrade 3 bzw. 4 wurden festgestellt, wenn eine für das Auge deutlich sichtbare Bandenfärbung zu beobachten war. Der Färbungsgrad 4 unterscheidet sich vom Färbungsgrad 3 dahingehend, dass die Farbreaktion sehr stark war (Abb. 9). Der Färbungsgrad 3 weist auf eine positive Antigen-Antikörperreaktion hin. Der Färbungsgrad 4 definiert für dieses Antigen eine sehr gute Antigen-Antikörperreaktion und kann auf eine Sättigung der Antigen-Antikörperreaktion hindeuten.

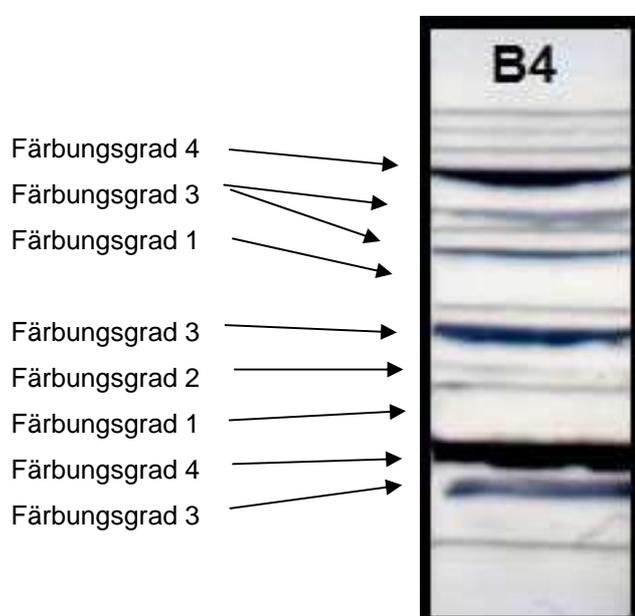


Abb. 9: Beispiele für den visuellen Färbungsgrad der Antigenbanden

In der Abbildung 9 sind am Beispiel eines HCMV-Mikroblots Beispiele für den visuellen Färbungsgrad gezeigt.

1010 von 101 Patienten mit dem HCMV-Mikroblot und HHV6-Mikroblot ermittelte digitale Datenpunkte wurden den visuellen Färbungsgraden von 1-4 zugeordnet. Trotz aufgeführter methodischer (Hintergrundfärbung) und Software bedingter Probleme (Programmmaske) korrelieren ca. 75% der gemessenen digitalen Daten mit der Farbdichte der Antigenbande und stellen somit Werte dar, an dem sich der visuelle Färbungsgrad anlehnen sollte. Im Diagramm 2 wird sichtbar, dass die Mittelwerte der vier digitalen Wertemengen mit steigendem visuellem Färbungsgrad potenziell ansteigen, wobei die vier Teilmengen große Standardabweichungen als Maß für die Streuung aufweisen. Um zu zeigen, dass die

digitalen nicht normalverteilten Wertemengen der vier visuellen Färbungsgrade vier unabhängige Farbabstufungen darstellen, wurde der Kruskal-Wallis Test und der Nemenyi-Test durchgeführt. Mit dem Kruskal-Wallis Test und dem sich anschließenden Nemenyi-Test konnte gezeigt werden, dass die Wertemengen der visuellen Färbungsgrade 1-4 signifikant (Kruskal-Wallis Test mit $p < 0.001$, $\alpha=0,05$) (Nemenyi-Test mit $p < 0,005$, $\alpha=0,05$) unabhängig voneinander sind.

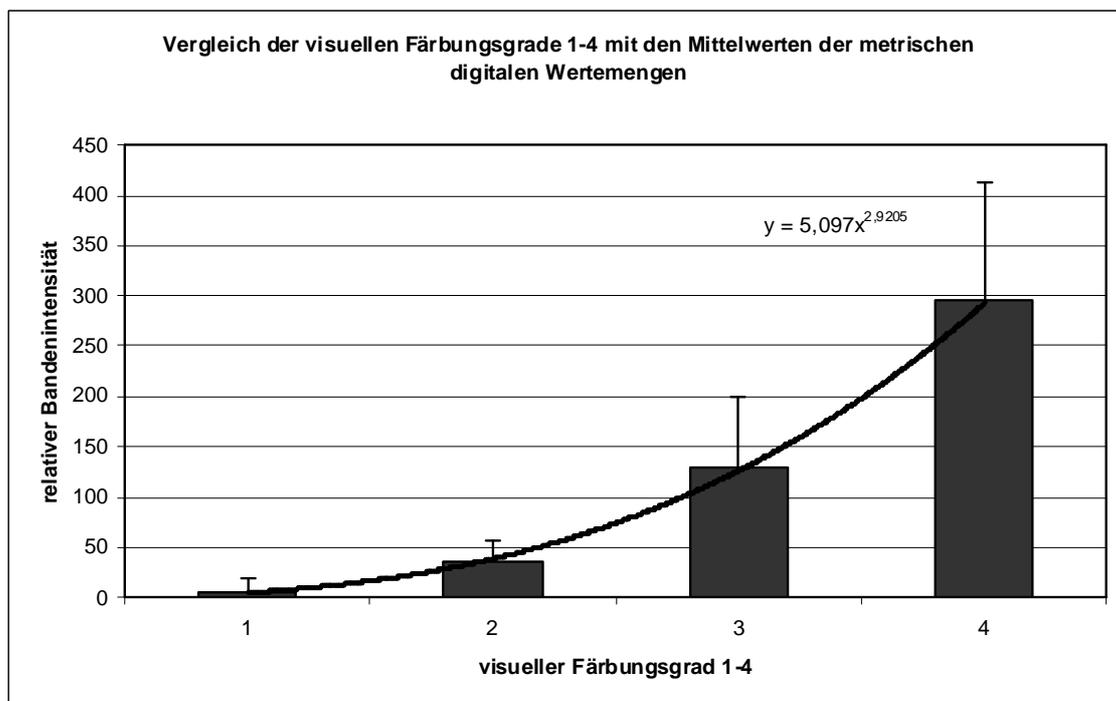


Diagramm 2: Zunahme der Mittelwerte der digitalen Wertemengen mit steigendem visuellen Färbungsgrad

Im Diagramm 2 sind die Mittelwerte der auf densitometrischer Grundlage ermittelten digitalen Wertemenge in Abhängigkeit von den vier in Rangfolge steigenden visuellen Färbungsgraden dargestellt. Dem Färbungsgrad 1 wurden 556, dem Färbungsgrad 2 100, dem Färbungsgrad 3 272 und dem Färbungsgrad 4 482 digitale Datenpunkte visuell zugeordnet. Im Diagramm 2 ist zu erkennen, dass die in der Rangfolge visuell steigenden Färbungsgrade mit den Mittelwerten der dem Färbungsgrad zugeordneten digitalen Wertemengen potenziell korrelieren, wobei große Standardabweichungen als Maß für die Streuung der digitalen Werte zu beobachten sind.

Da die Intervalle zwischen den visuellen Färbungsgraden 1-4 als gleich groß angenommen wurden, war die Addition der visuellen Färbungsgrade möglich. Die aus den visuellen Färbungsgraden der zehn Antigenbanden ermittelten Antigensummen der Mikroblots wurden daher wie metrische Daten behandelt. Die berechneten Antigensummen pro Mikroblot konnten somit zwischen 10 und 40 liegen.

Tabelle 17: Bildung der Antigensummen

In der Tabelle 17 ist an einem Beispiel die Bildung der Antigensumme demonstriert. In der oberen Zeile sind zehn beliebige Antigene pro Mikroblob durch die Zahlen 1 bis 10 dargestellt. Die in der zweiten Zeile aufgeführten visuellen Färbungsgrade 3+4+3+1... werden addiert und ergeben die Antigensumme von 23. Die kleinste zu errechnende Antigensumme liegt folglich bei 10, die größte berechenbare Antigensumme bei 40.

Bandennr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Antigensumme
Färbungsgrad	3	4	3	1	2	3	3	1	1	2	23

3.2.2 Optimierung der Reaktionsbedingungen im Mikroblob

Im Zuge der Antigenevaluierung mussten Probleme bei der Färbereaktion im Mikroblob gelöst werden. Die Abbildungen 10 bis 13 zeigen, dass durch die Verwendung eines Rotationsschüttlers (IKA-Schüttler MTS 2, IKA-Labortechnik) während der Inkubations- und Waschzeiten fleckige Hintergrundfärbungen stark reduziert und die Bandenfärbung spezifiziert sowie verstärkt werden konnten.

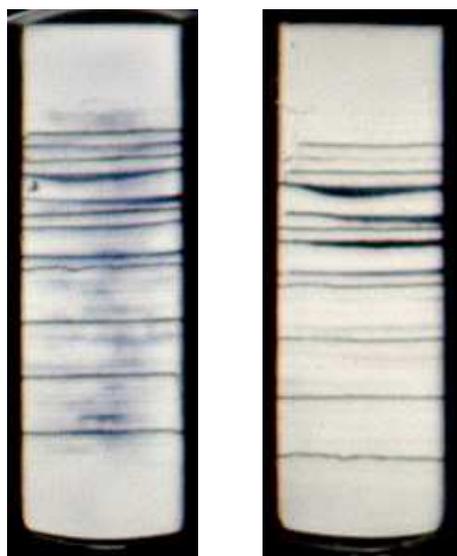


Abb. 10 u. 11: Reduktion der Hintergrundfärbung

In den Abbildungen 10 und 11 sind zwei HCMV-Mikroblots gezeigt, die mit einer Serumverdünnung von 1:100 inkubiert wurden. Die Abbildung 10 zeigt einen HCMV-Mikroblob, der während der Inkubations- und Waschzeiten nicht rotierte. Im Hintergrund und Bandenbereich kann man fleckige unspezifische Färbungen erkennen. In der Abbildung 11 sind diese unspezifischen Färbungen verschwunden. Bei der Färbung dieses Mikroblots wurde während der Inkubations- und Waschzeiten ein Rotationsschüttler verwendet, wodurch es zur Reduktion der unspezifischen Hintergrundfärbung kommt.

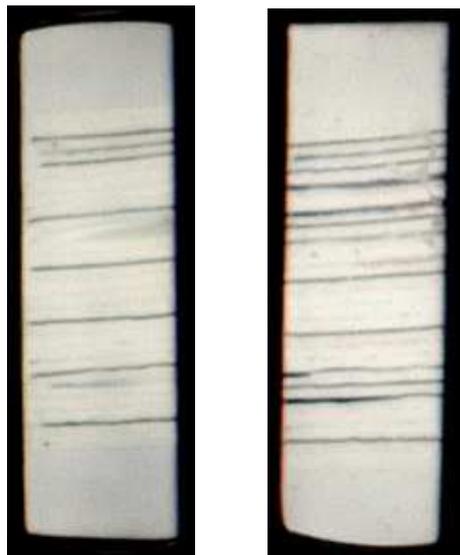


Abb. 12 u. 13: Verstärkung der spezifischen Bandenfärbung

In den Abbildungen 12 und 13 sind zwei HHV6-Mikroblots gezeigt, die mit einer Serumverdünnung von 1:50 inkubiert wurden. Die Abbildung 12 zeigt einen HHV6-Mikroblot, der während der Inkubations- und Waschzeiten nicht rotierte. Es sind nur sehr schwach gefärbte Banden wahrnehmbar. Die Bandenfärbung erscheint diffus. In der Abbildung 13 sieht man klar gefärbte Antigenbanden. Bei der Färbung dieses Mikroblots wurde während der Inkubations- und Waschzeiten ein Rotationsschüttler verwendet.

In einer Verdünnungsreihe wurde die Serum- und Konjugatverdünnung ermittelt, bei der eine gute Bandenfärbung und gleichzeitig eine geringe Hintergrundfärbung erreicht werden. Für den HHV6-IgG-Mikroblot stellte sich die Serumverdünnung von 1:50 mit der kombinierten Konjugatverdünnung von 1:25 als Optimum heraus. Für den HCMV-IgG-Mikroblot war eine Serumverdünnung von 1:100 mit der kombinierten Konjugatverdünnung von 1:25 optimal. Entscheidend für eine gute Färbung der Antigenbanden war die Konjugatverdünnung. Bei einer Konjugatverdünnung von 1:50 oder größer war nur eine schwache oder gar keine Bandenfärbung erkennbar. Zur Färbung der HHV6-Mikroblots war eine Serumverdünnung von 1:50 notwendig, da Serumverdünnungen größer als 1:100 zu einer sehr schlechten oder gar keiner Bandenfärbung führten. Serumverdünnungen größer als 1:100 verursachten bei der Färbung der HCMV-IgG-Mikroblots eine Abnahme der Färbungsintensität.

3.2.3 Plasma- und Liquordiagnostik – ein weiteres Einsatzfeld der Mikroblots

Neben den humanen Seren wurden Plasmen und Liquores in den Mikroblots getestet.

3.2.3.1 Plasmadiagnostik mit dem Mikroblob

Der zellfreie und flüssige Anteil vom Blut wird als Blutplasma bzw. Plasma bezeichnet. Das Plasma enthält im Gegensatz zum Blutserum bzw. Serum noch die Gerinnungsfaktoren. Im HCMV-IgG-Mikroblob oder HHV6-IgG-Mikroblob wurden die Plasmen gleich den Seren 1:100 oder 1:50 verdünnt. In den Abbildungen 14 und 15 ist sichtbar, dass die Plasmen und Seren, welche vom gleichen Patienten stammen und am gleichen Tag gewonnen wurden, im Mikroblob ein ähnliches bzw. gleich gefärbtes Bandenmuster aufwiesen. Um eine Aussage über die Vergleichbarkeit von Seren und Plasmen im semiquantitativen HCMV-IgG- bzw. HHV6-IgG-Mikroblob zu treffen, wurden von zehn Patienten die Serum- und Plasmaproben des gleichen Tages dreifach in einem Reaktionsansatz bestimmt. Pro Patient erfolgte daher die Bildung von sechs Antigensummen, die aus den Reaktivitäten der jeweils drei Seren und drei Plasmen ermittelt wurden. Mit der multivariaten Varianzanalyse mit Messwiederholung konnte gezeigt werden, dass die Gruppenmittelwerte der mit dem HCMV-IgG-Mikroblob ermittelten Antigensummen der Seren und Plasmen nicht signifikant verschieden sind ($p=0,072$, $\alpha=0,05$), wobei die unterschiedlichen multivariaten Prüfgrößen exakt den gleichen F-Wert und exakt die gleichen Signifikanzniveaus aufwiesen. Die Gruppenmittelwerte der im HHV6-IgG-Mikroblob ermittelten Antigensummen der Seren und Plasmen wurden mit allen multivariaten Prüfgrößen mit $p=0,057$ ($\alpha=0,05$) ebenfalls als nicht signifikant verschieden beurteilt. In den Diagrammen 3 und 4 ist sichtbar, dass die mit den HHV6-IgG- und HCMV-IgG-Mikroblob ermittelten Antigensummen der Seren und Plasmen korrelieren. Die graphische Korrelation der Antigensummen weist darauf hin, dass Seren und Plasmen, die an einem Tag vom gleichen Patienten entnommen wurden, vergleichbare Antigensummen aufweisen. Wie mit der multivariaten Analyse gezeigt werden konnte, sind Gruppenmittelwerte der im HCMV-IgG- und HHV6-IgG-Mikroblob ermittelten Antigensummen der Seren und Plasmen mit $p=0,072$ und $p=0,052$ als nicht signifikant verschieden zu bewerten. Jedoch weisen die Plots in den Diagrammen 5 und 6 darauf hin, dass Seren sowohl im HCMV-IgG-Mikroblob, als auch im HHV6-IgG-Mikroblob im Gruppenschnitt minimal stärkere Bandenfärbungen als Plasmen verursachen. Aus den Gruppenmittelwerten der Antigensummen der Seren und Plasmen lässt sich ermitteln, dass die Antigensummen der Seren im Durchschnitt um 0,5 „Summenstufen“ im HCMV-IgG-Mikroblob und um 0,4 „Summenstufen“ im HHV6-IgG-Mikroblob größer als die Antigensummen der Plasmen sind. Weiterhin zeigen die Streumatrizen (Diagramm 3 und 4), dass sich das Muster der korrelierenden Datenpunkte wiederholt, was auf vergleichbare Antigensummen bei Wiederholungsbestimmungen hinweist. Außerdem zeigt die multivariate Varianzanalyse, dass sich die Gruppenmittelwerte der Antigensummen über die beiden Gruppen (Seren und Plasmen) in der Wiederholung, sowohl für den HCMV-IgG-Mikroblob mit $p=0,944$ ($\alpha=0,05$), als auch für den HHV6-IgG-Mikroblob mit $p=0,475$ ($\alpha=0,05$) nicht signifikant unterscheiden.

Auch in diesem Test zeigten alle multivariaten Prüfgrößen exakt den gleichen F-Wert und exakt die gleichen Signifikanzniveaus. Außerdem wurde mit der multivariaten Varianzanalyse gezeigt, dass sich Gruppenmittelwerte der interaktiven Gruppen der Seren und Plasmen sowohl für den HCMV-IgG-Mikroblot mit $p=0,597$ ($\alpha=0,05$), als auch für den HHV6-IgG-Mikroblot mit $p=0,899$ ($\alpha=0,05$) bei Wiederholung nicht signifikant unterscheiden. Auch in diesem Fall weisen alle Prüfgrößen exakt die gleichen F-Werte und Signifikanzniveaus auf. In den Diagrammen 7 und 8 sind für den HCMV-IgG-Mikroblot und den HHV6-IgG-Mikroblot die ermittelten Gruppenmittelwerte der Antigensummen für die Seren und Plasmen in der Wiederholung graphisch dargestellt. Im Diagramm 7 ist sichtbar, dass die Gruppenmittelwerte der im HCMV-IgG-Mikroblot ermittelten Antigensummen der Seren bei Dreifachbestimmung minimal um 0,15 „Summenstufen“ und der Plasmen minimal um 0,1 „Summenstufen“ schwanken. Die Gruppenmittelwerte der im HHV6-IgG-Mikroblot ermittelten Antigensummen der Seren schwanken vergleichbar minimal um durchschnittlich 0,1 „Summenstufen“ und der Plasmen um durchschnittlich 0,2 „Summenstufen“. Weiterhin werden in den Diagrammen 7 und 8 noch einmal die durchschnittlich größeren Gruppenmittelwerte der im HCMV-IgG- und HHV6-IgG-Mikroblot ermittelten Antigensummen der Seren gegenüber den Plasmen verdeutlicht.

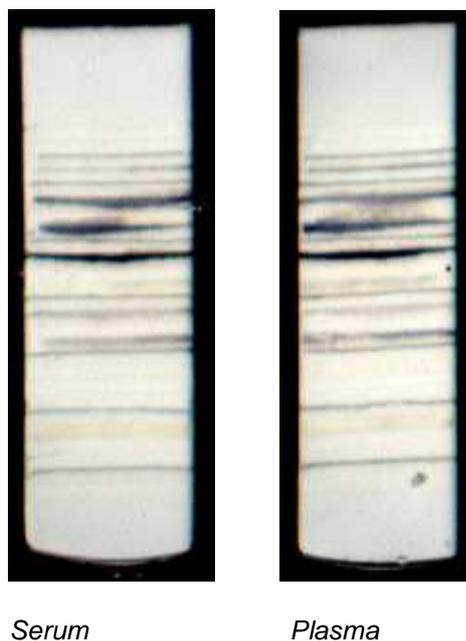


Abb. 14 u. 15: Vergleich der zwei mit Serum oder Plasma inkubierten HCMV-IgG-Mikroblots

Die Abbildungen 14 und 15 zeigen zwei HCMV-IgG-Mikroblots, wovon der linke Mikroblot mit einem Serum 1:100 und der rechte Mikroblot mit einem Plasma von 1:100 inkubiert wurden. Die Abbildungen zeigen ein einheitliches Bild und weisen keine sichtbaren Unterschiede im Bandenmuster auf.

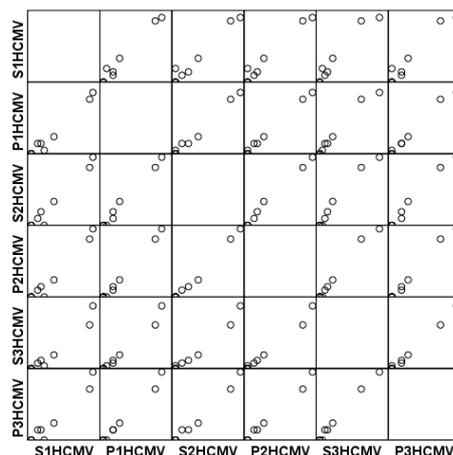


Diagramm 3: graphische Korrelation der im HCMV-IgG-Mikroblot ermittelten Antigensummen von Seren und Plasmen in einer Streumatrix

Im Diagramm 3 sind die im HCMV-IgG-Mikroblot ermittelten Antigensummen der zehn Serum-/Plasma-paare in 3-facher Wiederholung als Punkte in einer Streumatrix graphisch dargestellt. Die graphische Korrelation der Antigensummen von Seren und Plasmen verweist auf eine Vergleichbarkeit der Antigensummen der Serum-/Plasma-paare. Weiterhin wird im Diagramm 3 durch das sich wiederholende Muster der Datenpunkte eine Vergleichbarkeit der Antigensummen der Serum-/Plasma-paare bei Wiederholungsbestimmung verdeutlicht.

S = Serum, P = Plasma, 1,2,3 = Wiederholungsanzahl

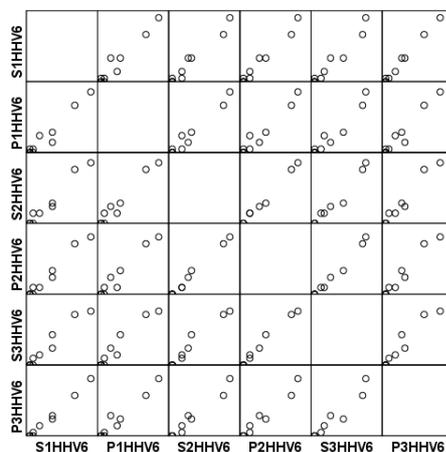


Diagramm 4: graphische Korrelation der im HHV6-IgG-Mikroblot ermittelten Antigensummen von Seren und Plasmen in einer Streumatrix

Im Diagramm 4 sind die im HHV6-IgG-Mikroblot ermittelten Antigensummen der zehn Serum-/Plasma-paare in 3-facher Wiederholung als Punkte in einer Streumatrix graphisch dargestellt. Die graphische Korrelation der Antigensummen von Seren und Plasmen verweist auf eine Vergleichbarkeit der Antigensummen der Serum-/Plasma-paare. Weiterhin wird im Diagramm 4 durch das sich wiederholende Muster der Datenpunkte eine Vergleichbarkeit der Antigensummen der Serum-/Plasma-paare bei Wiederholungsbestimmung verdeutlicht.

S = Serum, P = Plasma, 1,2,3 = Wiederholungsanzahl

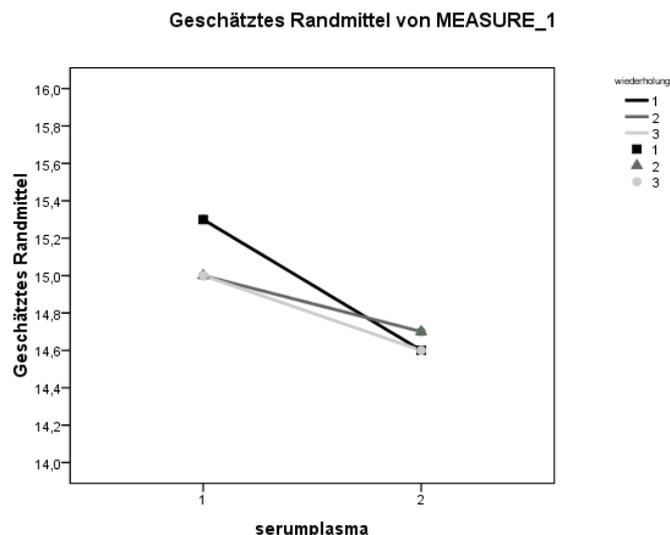


Diagramm 5: Vergleich der Gruppenmittelwerte der im HCMV-IgG-Mikroblot ermittelten Antigensummen der Seren und Plasmen

Im Diagramm 5 sind die Gruppenmittelwerte der im HCMV-IgG-Mikroblot dreifach ermittelten Antigensummen der zehn Serum-/ Plasmapaare graphisch dargestellt. Dass die Seren eine minimal stärkere Bandenfärbung als Plasmen verursachen, wird durch den Abfall der Gruppenmittelwerte der Antigensummen der zehn Serum-/ Plasmapaare dargestellt, wobei die Punkte links von den Geraden die Gruppenmittelwerte der Antigensummen für die zehn Seren und die Punkte rechts von den Geraden die Gruppenmittelwerte der Antigensummen für die zehn Plasmen wiedergeben.

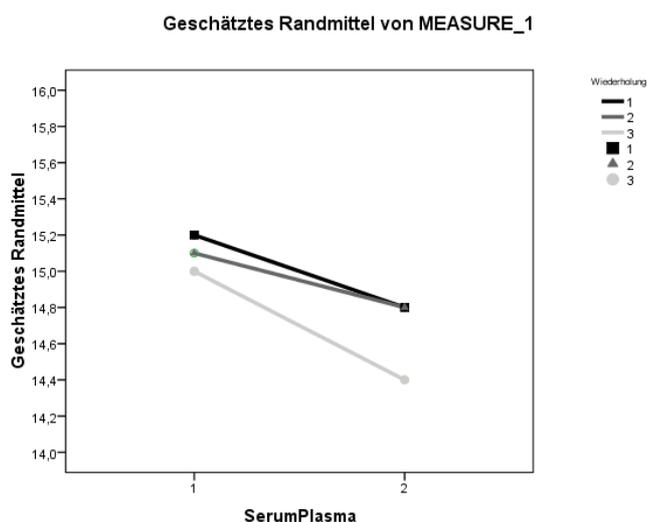


Diagramm 6: Vergleich der Gruppenmittelwerte der im HHV6-IgG-Mikroblot ermittelten Antigensummen der Seren und Plasmen

Im Diagramm 6 sind die Gruppenmittelwerte der im HHV6-IgG-Mikroblot dreifach ermittelten Antigensummen der zehn Serum-/ Plasmapaare graphisch dargestellt. Dass die Seren eine minimal stärkere Bandenfärbung als Plasmen verursachen wird durch den Abfall der

Gruppenmittelwerte der Antigensummen der zehn Serum-/ Plasmapaare dargestellt, wobei die Punkte links von den Geraden die Gruppenmittelwerte der Antigensummen für die zehn Seren und die Punkte rechts von den Geraden die Gruppenmittelwerte der Antigensummen für die zehn Plasmen wiedergeben.

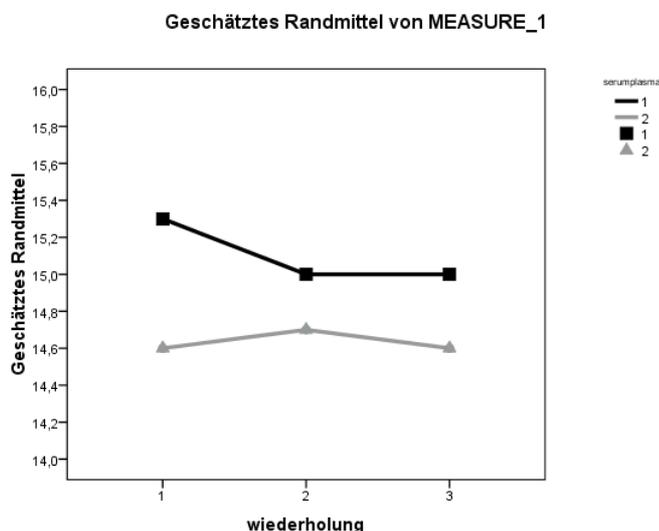


Diagramm 7: Vergleich der Gruppenmittelwerte der im HCMV-IgG-Mikroblot ermittelten Antigensummen der Seren und Plasmen bei Dreifachbestimmung

Im Diagramm 7 sind die Gruppenmittelwerte der im HCMV-IgG-Mikroblot dreifach ermittelten Antigensummen der zehn Serum-/ Plasmapaare graphisch dargestellt. Das Diagramm 7 zeigt, dass die gruppendurchschnittlichen im HCMV-IgG-Mikroblot ermittelten Antigensummen der Seren in der Wiederholung um 0,15 „Summenstufen“ und die gruppendurchschnittlichen Antigensummen der Plasmen um 0,1 „Summenstufen“ schwanken, wobei die dunkelgraue Linie die durchschnittlichen Antigensummen der Seren darstellt und die hellgraue Linie die durchschnittlichen Antigensummen der Plasmen wiedergibt. Weiterhin wird im Diagramm 7 noch einmal deutlich, dass die Gruppenmittelwerte der im HCMV-IgG-Mikroblot ermittelten Antigensummen der Seren größer sind als die Gruppenmittelwerte der ermittelten Antigensummen der Plasmen.

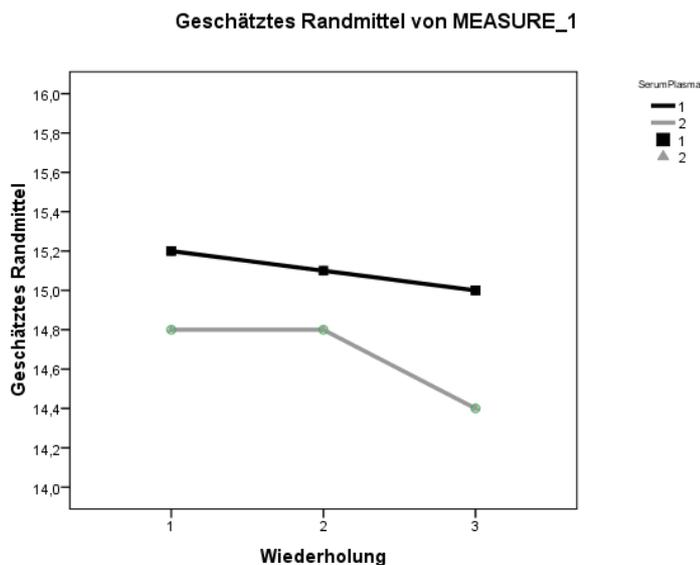


Diagramm 8: Vergleich der Gruppenmittelwerte der im HHV6-IgG-Mikroblot ermittelten Antigensummen der Seren und Plasmen bei Dreifachbestimmung

Im Diagramm 8 sind die Gruppenmittelwerte der im HHV6-IgG-Mikroblot dreifach ermittelten Antigensummen der zehn Serum-/ Plasmapaare graphisch dargestellt. Das Diagramm 7 zeigt, dass die gruppendurchschnittlichen im HHV6-IgG-Mikroblot ermittelten Antigensummen der Seren in der Wiederholung um 0,1 „Summenstufen“ und die gruppendurchschnittlichen Antigensummen der Plasmen um 0,2 „Summenstufen“ schwanken, wobei die dunkelgraue Linie die durchschnittlichen Antigensummen der Seren darstellt und die hellgraue Linie die durchschnittlichen Antigensummen der Plasmen wiedergibt. Weiterhin wird im Diagramm 8 noch einmal deutlich, dass die Gruppenmittelwerte der im HHV6-IgG-Mikroblot ermittelten Antigensummen der Seren größer sind als die Gruppenmittelwerte der ermittelten Antigensummen der Plasmen.

3.2.3.2 Liquordiagnostik mit dem Mikroblot

Es wurden acht Liquores von fünf Patienten (1 bis 47 Jahre) im HCMV- und HHV6-Mikroblot getestet, denen am gleichen Tag Serum abgenommen wurde. Zwei der fünf Patienten wurden wegen dem Verdacht auf Meningitis behandelt. Weitere zwei Patienten wurden wegen dem Verdacht einer Enzephalitis und ein anderer Patient wegen dem Verdacht auf Demenz behandelt. Alle fünf Patienten wiesen eine positive HHV6-PCR auf. Drei Patienten waren HCMV positiv. Die Liquores wurden in einer Verdünnung von 1:2 eingesetzt. Das Immunglobulin G ist im Liquor durchschnittlich um den Faktor 200 geringer konzentriert als im Serum. Um die Daten der Liquores mit den dazugehörigen Seren zu vergleichen, wurde neben der 1:100 Serumverdünnung eine 1:400 Serumverdünnung mitgeführt.

Die drei HCMV-Mikroblotbilder (Abb. 16, 17, 18) und die drei HHV6-Mikroblotbilder (Abb. 19 bis 21) zeigen jeweils für einen Patienten das Antigen-spezifische Antikörpermuster von zwei Serumverdünnungen (1:100; 1:400) und einer Liquorverdünnung (1:2).

3.2.3.2.1 Liquordiagnostik mit dem HCMV-Mikroblot

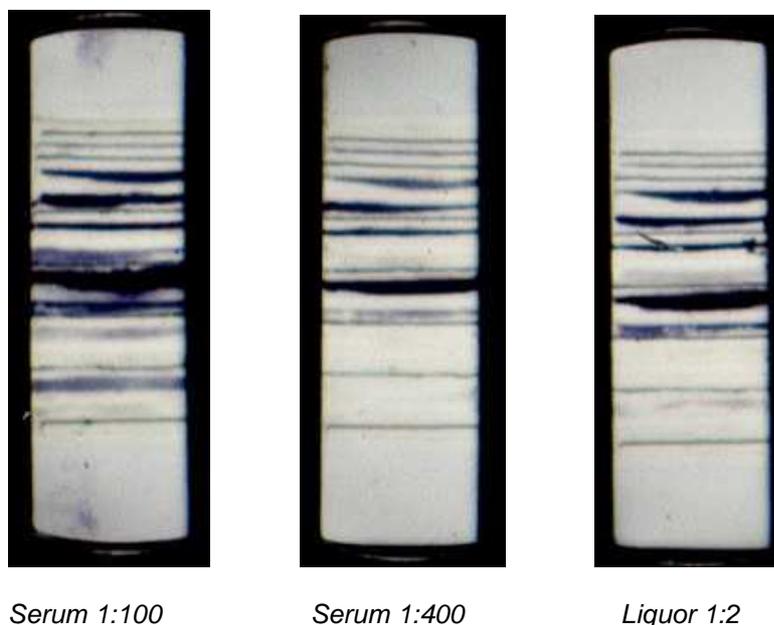


Abb. 16, 17, 18: Vergleich der 3 mit Seren und Liquor inkubierten HCMV-IgG-Mikroblots

Die Abbildungen 16 bis 18 zeigen 3 HCMV-IgG-Mikroblots, die mit dem Serum (1:100 und 1:400 Verdünnung) und Liquor (1:2 Verdünnung) eines Patienten inkubiert wurden. Die Bandenmuster der Mikroblots zwei und drei sind vergleichbar und zeigen, dass der Patient einen zum Serum vergleichbaren Antikörperpool im Liquor aufweist.

Acht Liquores und die dazugehörigen acht Seren von fünf Patienten wurden im HCMV-IgG-Mikroblot getestet. Vier der acht Seren waren serologisch HCMV positiv. Sie wiesen auch in den zu untersuchenden Liquores HCMV-IgG-Antikörper auf. Drei der vier HCMV positiven Liquores erzeugten im HCMV-IgG-Mikroblot Bandenmuster, die mit den Bandenmustern der dazugehörigen 1:400 verdünnten Seren vergleichbar sind. In den Abb. 16 bis 18 ist dies am Beispiel eines Patienten dokumentiert. Der in der Abb. 16 gezeigte HCMV-Mikroblot wurde mit dem 1:100 verdünnten Serum eines HCMV-positiven Patienten inkubiert. Acht von zehn Antigenen reagierten gut bis sehr gut mit den Patientenantikörpern. Die Abb. 17 zeigt einen HCMV-IgG-Mikroblot des gleichen Patienten, der mit einem 1:400 verdünnten Serum inkubiert wurde. Auf Grund der höheren IgG-Antikörperverdünnung ist eine Abnahme der Farbstärke und der reaktiven Banden zu beobachten. Nur noch fünf der zehn HCMV-Antigene reagierten gut bis sehr gut mit den HCMV-Antikörpern. Der im HCMV-IgG-Mikroblot getestete Liquor des Patienten zeigte ein zum 1:400 verdünnten Serum vergleichbares

Bandenmuster (Abb. 18). Die IgG-Quotienten nach Reiber wurden im aktuellen Fall nicht berücksichtigt, da diese Experimentreihe erste Versuche mit Liquores dokumentieren soll und nur die Möglichkeit der Liquordiagnostik mit dem HCMV-Mikroblot aufweisen soll. Einer der vier HCMV positiven Liquores wies im Vergleich zum 1:400 verdünnten Serum eine schwächere HCMV-IgG-Antikörperantwort im HCMV-IgG-Mikroblot auf.

3.2.3.2.2 Liquordiagnostik mit dem HHV6-Mikroblot

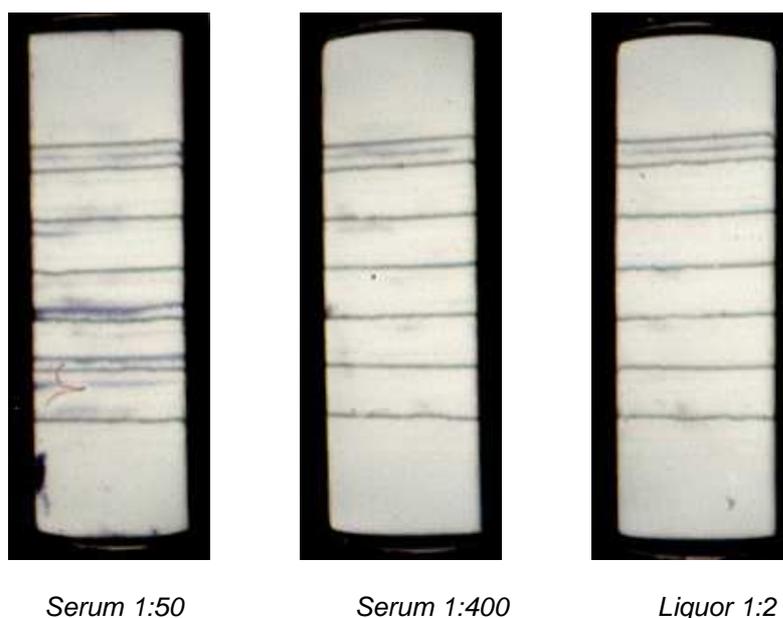


Abb. 19, 20, 21: Vergleich der 3 mit Seren und Liquor inkubierten HHV6-IgG-Mikroblots

Die Abbildungen 19 bis 21 zeigen 3 HHV6-IgG-Mikroblots, die mit dem Serum (1:100 und 1:400 Verdünnung) und Liquor (1:2 Verdünnung) eines Patienten inkubiert wurden. Im ersten HHV6-IgG-Mikroblot sind drei Antigenbanden schwach bis gut gefärbt (Färbungsgrad 2-3). Der zweite und dritte HHV6-Mikroblot zeigen dagegen keine gefärbten Antigenbanden.

In einer weiteren Experimentreihe wurden die acht Liquores der fünf Patienten und die dazugehörigen acht Seren im HHV6-IgG-Mikroblot getestet. Sechs der acht Seren zeigten im HHV6-IgG-Mikroblot bei einer Serumverdünnung von 1:50 eine schwache bis gute Reaktivität der HHV6-IgG-Antikörper mit mindestens einem Antigen. Bei zwei der acht Seren war keine Reaktivität mit den Antigenen im HHV6-IgG-Mikroblot zu erkennen. Alle acht Liquores zeigten im HHV6-IgG-Mikroblot keine Reaktivität mit den Antigenen. Die zum Vergleich mitgeführten acht 1:400 verdünnten HHV6-Seren zeigten mit den zu testenden HHV6-Antigenen im HHV6-Mikroblot ebenfalls keine Reaktivität. In den Abbildungen 19 bis 21 ist die Reaktivität des Serums und des Liquores eines Patienten mit den Antigenen im HHV6-Mikroblot dargestellt. Die Abb. 19 zeigt den HHV6-IgG-Mikroblot, der mit dem Patientenserum bei einer Verdünnung von 1:50 inkubiert wurde. Vier der zehn Antigene

reagierten schwach bis gut mit den Patientenantikörpern. Die Abb. 20 stellt den HHV6-IgG-Mikroblot des gleichen Patienten dar, der mit dem 1:400 verdünnten Serum inkubiert wurde. Es konnte keine Reaktivität der Antigenbanden mit HHV6-IgG-Antikörpern des Patientenserums bei einer Verdünnung von 1:400 dokumentiert werden. Der getestete Liquor des Patienten zeigt im HHV6-IgG-Mikroblot ebenfalls keine Reaktivität mit den Antigenen (Abb. 21). Auf Grund der schwachen Reaktivität der HHV6-Antigene mit den HHV6-IgG-Antikörpern im Liquor ist eine Liquordiagnostik mit dem HHV6-Mikroblot im aktuellen Zustand nicht möglich.

3.2.4 Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit der Messergebnisse im Mikroblot

Die Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit der visuellen Färbungsgrade im Bereich der Antigenbanden erfolgten in zwei Schritten. Im ersten Schritt wurde die Reproduzierbarkeit der Färbungsgrade analysiert, die sich aus der wiederholten Bestimmung von in einem Reaktionsansatz getesteten zehn Patientenseren ergab. In einer sich anschließenden Untersuchung wurde dann die Reproduzierbarkeit der Färbungsgrade überprüft, die sich aus der wiederholten Bestimmung von an zwei verschiedenen Tagen und daher aus zwei Reaktionsansätzen getesteten Seren ergab.

3.2.4.1 Dreifachbestimmung von zehn Testseren im HCMV- und HHV6-Mikroblot

In der ersten Untersuchung zur Reproduzierbarkeit der Färbungsgrade im Antigenbandenbereich an einem Tag wurden zehn Patientenseren dreifach im semiquantitativen HCMV-IgG- bzw. HHV6-IgG-Mikroblot in einem Reaktionsansatz getestet, die visuellen Färbungsgrade der Antigenbanden ermittelt und die Ergebnisse in drei Stufen analysiert (intra-assay-Varianz). Im ersten Schritt wurde die Reproduzierbarkeit der Färbungsgrade der einzelnen Antigene untersucht. Im zweiten Ansatz folgte die Untersuchung zur Reproduzierbarkeit der aus den Färbungsgraden gebildeten Antigensummen und im dritten Ansatz wurde die Reproduzierbarkeit der serologischen HCMV- bzw. HHV6-Aussagen im Mikroblot untersucht (inter-assay-Varianz).

3.2.4.1.1 Reproduzierbarkeit der Färbungsgrade einzelner Antigenbanden

88% aller Antigene im HCMV-IgG-Mikroblot und 84% aller Antigene im HHV6-IgG-Mikroblot wiesen bei dreifacher Bestimmung den gleichen Färbungsgrad auf. Bei einer Analyse der „reaktiven Antigene“ fiel die Reproduzierbarkeit der Färbungsgrade der Antigene auf 54% im HCMV-IgG-Mikroblot und 50% im HHV6-IgG-Mikroblot ab. Unter den „reaktiven Antigenen“ werden die Antigene verstanden, die mindestens einmal mit den Antikörpern der

Patientenseren reagierten. 91,7% der Antigenreaktionen im HCMV-IgG-Mikroblot und 100% der Antigenreaktionen im HHV6-IgG-Mikroblot, die nicht reproduzierbar waren, unterschieden sich um einen Färbungsgrad. Nur ein „reaktives Antigen“ (3,8%) im HCMV-IgG-Mikroblot wies bei wiederholter Bestimmung Unterschiede um zwei Färbungsgrade auf.

Tabelle 18: tabellarische Zusammenfassung der in einem Reaktionsansatz ermittelten reproduzierbaren visuellen Färbungsgrade der Antigenbanden in Dreifachbestimmung

HCMV-Mikroblot	
reproduzierbare visuelle Färbungsgrade	
für alle Antigene	nur „reaktive Antigene“
88%	54%
HHV6-Mikroblot	
reproduzierbare visuelle Färbungsgrade	
für alle Antigene	nur „reaktive Antigene“
84%	50%

Im zweiten Analyseansatz wurde die Reproduzierbarkeit der Antigensummen der Seren mittels univariater Varianzanalyse mit Messwiederholung geprüft. Nach der Prüfung der Sphärizitätsannahme mit dem Mauchly-Test ergab die Analyse, dass die Gruppenmittelwerte der im HCMV-IgG-Mikroblot ermittelten Antigensummen der zehn Seren mit $p=0,785$ ($\alpha=0,05$) sich nicht signifikant unterscheiden. Die Gruppenmittelwerte der im HHV6-IgG-Mikroblot ermittelten Antigensummen der zehn Seren waren mit $p=0,897$ ($\alpha=0,05$) ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich. Die Gruppenmittelwerte der im HCMV-IgG-bzw. HHV6-IgG-Mikroblot ermittelten Antigensummen der Seren wiesen in der Wiederholung Schwankungen von 0,15 „Summenstufen“ und von 0,1 „Summenstufen“ auf.

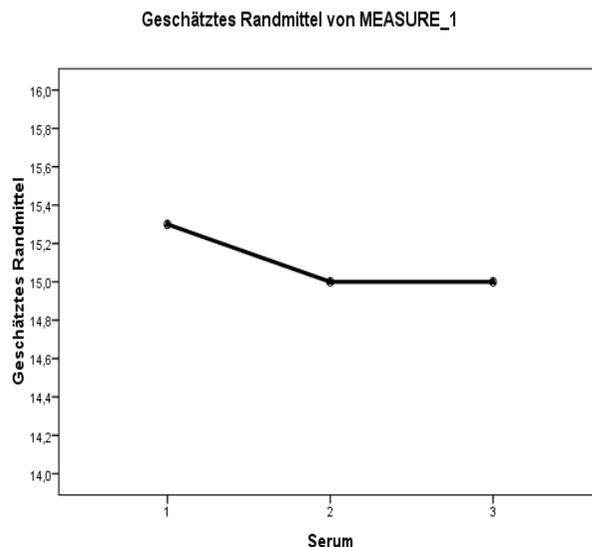


Diagramm 9: Vergleich der Gruppenmittelwerte der im HCMV-IgG-Mikroblot ermittelten Antigensummen der Seren bei Dreifachbestimmung

Im Diagramm 9 sind die Gruppenmittelwerte der im HCMV-IgG-Mikroblot dreifach ermittelten Antigensummen der zehn getesteten Seren bei Dreifachbestimmung graphisch dargestellt, wobei jeder Punkt einen Gruppenmittelwert der Antigensummen der zehn Seren je Bestimmung widerspiegelt. Das Diagramm 9 verweist darauf, dass sich die Gruppenmittelwerte der im HCMV-IgG-Mikroblot ermittelten Antigensummen der Seren in der Wiederholung um 0,3 „Summenstufen“ unterscheiden.

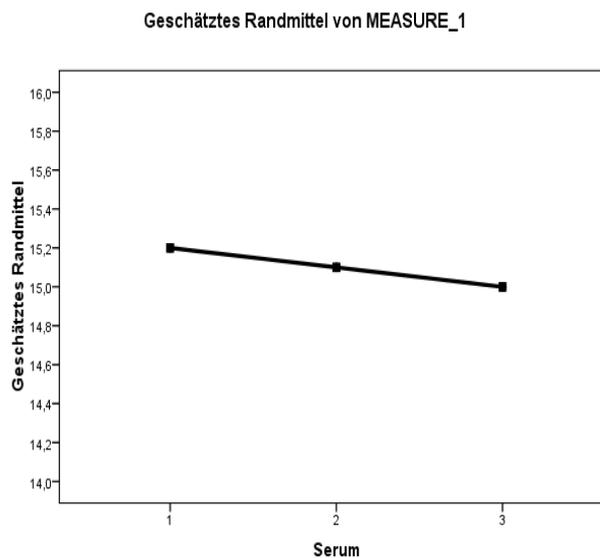


Diagramm 10: Vergleich der Gruppenmittelwerte der im HHV6-IgG-Mikroblot ermittelten Antigensummen der Seren bei Dreifachbestimmung

Im Diagramm 10 sind die Gruppenmittelwerte der im HHV6-IgG-Mikroblot dreifach ermittelten Antigensummen der 10 getesteten Seren bei Dreifachbestimmung graphisch dargestellt, wobei

jeder Punkt einen Gruppenmittelwert der Antigensummen der 10 Seren je Bestimmung widerspiegelt. Das Diagramm 10 verweist darauf, dass sich die Gruppenmittelwerte der im HHV6-IgG-Mikroblot ermittelten Antigensummen der Seren in der Wiederholung um 0,1 „Summenstufen“ unterscheiden.

3.2.4.1.3 Reproduzierbarkeit der serologischen Aussagen

In einer dritten Analyse wurde die Reproduzierbarkeit der serologischen Aussagen beurteilt. Als serologisch positiv wurde ein Serum oder Plasma definiert, wenn mindestens eins von zehn Antigenen einen visuellen Färbungsgrad von 3 aufwies. Als grenzwertig wurde ein Serum oder Plasma definiert, wenn mindestens eins der zehn Antigene einen visuellen Färbungsgrad von 2 aufwies. Wenn alle zehn Antigene keine Reaktionen zeigten, wurde das Serum oder Plasma bezogen auf dieses Virus als serologisch negativ beurteilt. Mit dem HCMV-IgG-Mikroblot bzw. dem HHV6-IgG-Mikroblot konnte bei dreifacher Testung der Seren für 90% bzw. 80% der Patienten der gleiche HCMV- bzw. HHV6-Status ermittelt werden.

3.2.4.2 Zweifachbestimmung von 17 bzw. 10 Seren im HCMV- und HHV6-Mikroblot an zwei verschiedenen Tagen

In einer zweiten Untersuchung zur Reproduzierbarkeit der Färbungsgrade im Antigenbandenbereich an verschiedenen Tagen wurden 17 und 10 Patientenserum an zwei verschiedenen Tagen in einem zeitlichen Abstand von 76 Tagen im semiquantitativen HCMV-IgG- bzw. HHV6-IgG-Mikroblot getestet, die visuellen Färbungsgrade der Antigenbanden ermittelt und die Ergebnisse analysiert.

3.2.4.2.1 Reproduzierbarkeit der Antigensummen

Die aus den Färbungsgraden der Antigenbanden gebildeten Antigensummen wurden in einem t-Test analysiert. Dieser ergab, dass zwischen den im HCMV-IgG- und HHV6-IgG-Mikroblot ermittelten Antigensummen der Serumpaare signifikante Unterschiede mit $p=0,00$ ($\alpha=0,05$) bzw. $p=0,02$ ($\alpha=0,05$) vorhanden sind. Im Diagramm 11 wird der Unterschied zwischen den gruppenschnittlichen Antigensummen von 21,88 am Tag 1 und von 18,65 am Tag 2 für den HCMV-IgG-Mikroblot sowie im Diagramm 12 von 13,6 Standardwerten am Tag 1 und von 11,6 Standardwerten am Tag 2 für den HHV6-IgG-Mikroblot graphisch verdeutlicht.

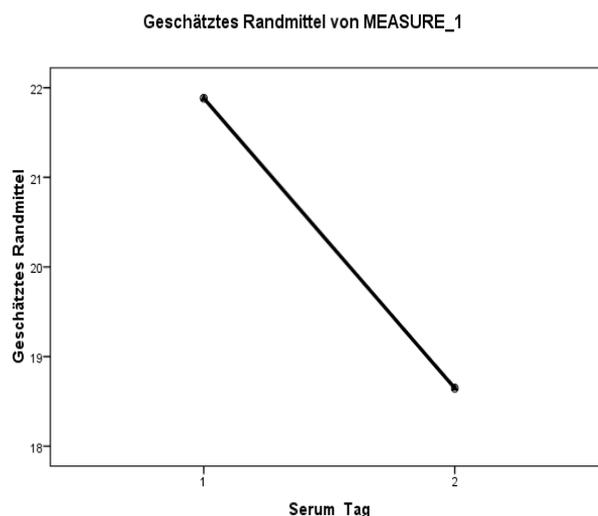


Diagramm 11: Vergleich der Gruppenmittelwerte der an zwei verschiedenen Tagen im HCMV-IgG-Mikroblot ermittelten Antigensummen der Seren

Im Diagramm 11 sind die Gruppenmittelwerte der im HCMV-IgG-Mikroblot an zwei verschiedenen Tagen ermittelten Antigensummen der 17 getesteten Seren in der Wiederholung graphisch dargestellt, wobei jeder Punkt einen Gruppenmittelwert der Antigensummen pro Wiederholung widerspiegelt. Das Diagramm 11 verdeutlicht, dass die Gruppenmittelwerte der im HCMV-IgG-Mikroblot ermittelten Antigensummen der Seren mit 21,88 Standardwerten am Tag 1 und mit 18,65 Standardwerten am Tag 2 in der Wiederholung schwanken.

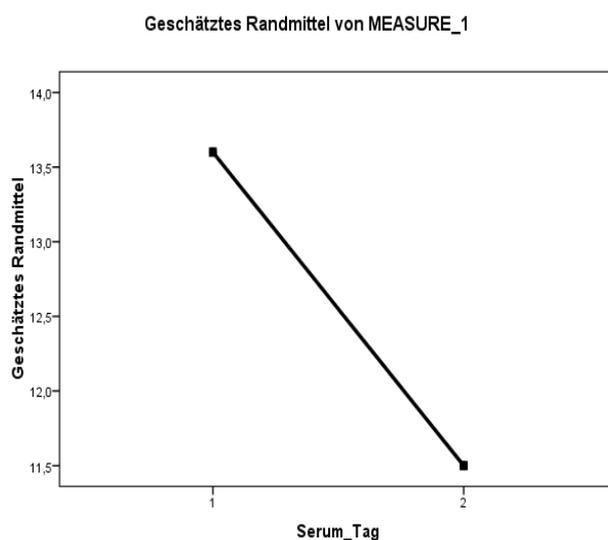


Diagramm 12: Vergleich der Gruppenmittelwerte der an zwei verschiedenen Tagen im HHV6-IgG-Mikroblot ermittelten Antigensummen der Seren

Im Diagramm 12 sind die Gruppenmittelwerte der im HHV6-IgG-Mikroblot an zwei verschiedenen Tagen ermittelten Antigensummen der 17 getesteten Seren in der Wiederholung graphisch dargestellt, wobei jeder Punkt einen Gruppenmittelwert der Antigensummen pro Wiederholung widerspiegelt. Das Diagramm 12 verdeutlicht, dass die Gruppenmittelwerte der

im HHV6-IgG-Mikroblot ermittelten Antigensummen der Seren mit 13,6 Standardwerten am Tag 1 und mit 11,6 Standardwerten am Tag 2 in der Wiederholung deutlich schwanken.

3.2.4.2.2 Reproduzierbarkeit der serologischen Aussagen bei Bestimmung an zwei verschiedenen Tagen

In einem folgenden Schritt wurde die Reproduzierbarkeit der serologischen Aussagen für die im HCMV-IgG-Mikroblot getesteten 17 Serumpaare und für die im HHV6-IgG-Mikroblot getesteten 10 Serumpaare an zwei verschiedenen Tagen in einem zeitlichen Abstand von 76 Tagen analysiert. Die Analyse ergab, dass für 82% von siebzehn im HCMV-IgG-Mikroblot getesteten Seren am zweiten Tag die gleiche serologische Aussage gefunden wurde. Weiterhin wurde gezeigt, dass 60% von zehn im HHV6-IgG-Mikroblot getesteten Seren am zweiten Tag die gleiche serologische Aussage wie am ersten Tag aufwiesen.

3.2.5 Sensitivitäts- und Spezifitätstestung des HCMV-Mikroblots

Sensitivität und Spezifität sind die Qualitätskriterien jedes diagnostischen Testverfahrens. Unter der Sensitivität versteht man den Prozentsatz an richtig positiv bestimmten Seren. Das heißt, je mehr positive Seren mit der Mikroblotmethode als positiv erkannt werden, umso sensitiver ist das Testverfahren. Spezifisch ist die Mikroblotmethode, wenn serologisch negative Seren in einem hohen Prozentsatz als negativ erkannt werden. Als serologisch positiv wurde ein Serum definiert, wenn mindestens eins von zehn Antigenen einen visuellen Färbungsgrad von 3 aufwies. Als grenzwertig wurde ein Serum definiert, wenn mindestens eins von zehn Antigenen einen visuellen Färbungsgrad von 2 aufwies. Wenn alle zehn Antigene keine Reaktion zeigten, wurde das Serum bezogen auf dieses Virus als serologisch negativ beurteilt.

Zur Einschätzung der Sensitivität und Spezifität des HCMV-IgG-Mikroblots wurden als Standard humane Seren herangezogen, die in der Routinediagnostik des Institutes für Virologie mittels Enzygnost* Anti-CMV-IgG Testsystem (Dade Behring, Marburg) getestet wurden. Außerdem diente der HCMV IgG-recomBlot (Mikrogen, Neuried) - ein weiteres diagnostisches Testsystem - als Vergleichssystem.

Für den HCMV-IgG-Mikroblot konnte an 60 getesteten Seren (30 Negativseren und 30 Positivseren) eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 80% gezeigt werden. Die Antigene HCMV pp150-F1, HCMV pp150-F2, HCMV gB-F2, HCMV gB-F3, HCMV pp65-F1 und HCMV pp65-F2 reagierten in unterschiedlicher Stärke von schwacher Reaktivität bis deutlicher Reaktion (Färbungsgrad 2 und 3) in unterschiedlichen Mustern mit sechs HCMV negativ getesteten Seren (mittels Enzygnost* Anti-CMV-IgG getestet). Bei einem Wiederholungsversuch zeigten die sechs HCMV-negativ getesteten Seren im HCMV-IgG-

Mikroblot keine Antikörperreaktion. Anhand der Verlaufskontrollen der sechs Patienten wurden die sechs fragwürdigen Seren serologisch als HCMV-negativ eingestuft.

Verglichen mit dem Enzygnost* Anti-CMV-IgG Testsystem (Dade Behring, Marburg) wurde für den HCMV IgG-recomBlot (Mikrogen, Neuried) eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 93,4% ermittelt. Von den zwei falsch-positiven Seren reagierte ein Serum ebenfalls mit dem HCMV-IgG-Mikroblot.

Außerdem wurden weitere 21 mittels Enzygnost* Anti-CMV-IgG Testsystem (Dade Behring, Marburg) als grenzwertig eingestufte Seren mit dem HCMV-Mikroblotsystem und dem HCMV IgG-recomBlot (Mikrogen, Neuried) getestet. Auf Grund der serologischen Verlaufsdaten und der klinischen Daten erfolgte die Einteilung der 21 Patientenserum in serologisch HCMV-negativ bzw. HCMV-positiv. Es wurden zwölf positive HCMV-Patienten und neun negative HCMV-Patienten identifiziert. Die Ergebnisse des HCMV-Mikroblots und des HCMV IgG-recomBlots (Mikrogen, Neuried) unterschieden sich deutlich (Diagramme 13 bis 16). Die zwölf positiv beurteilten HCMV-Seren wurden im HCMV-IgG-Mikroblot in 16,7% als HCMV-negativ, in 41,7% als HCMV-positiv und in 41,7% als HCMV-grenzwertig getestet (Diagramm 13). Der HCMV recomBlot von Mikrogen (Neuried) stufte die zwölf positiven Seren zu 91,7% als HCMV-positiv und 8,3% als HCMV-grenzwertig ein (Diagramm 15). Die neun negativ beurteilten HCMV-Seren wurden im HCMV-Mikroblot in 22,2% als HCMV-negativ, in 22,2% als HCMV-positiv und in 55,6% als HCMV-grenzwertig getestet (Diagramm 14). Der recomBlot von Mikrogen (Neuried) stufte die negativen Seren in 88,9% als HCMV-positiv und in 11,1% als HCMV-grenzwertig ein (Diagramm 16).

Alle drei HCMV-Testsysteme (HCMV-IgG-Mikroblot, HCMV IgG-recomBlot Enzygnost* Anti-CMV-IgG Testsystem) konnten die 21 fragwürdigen Seren nicht den richtigen serologischen Aussagen zuordnen. Es traten falsch-positive und falsch-negative Ergebnisse auf. Außerdem gab es zwischen den drei serologischen HCMV-Testsystemen deutliche Ergebnisunterschiede.

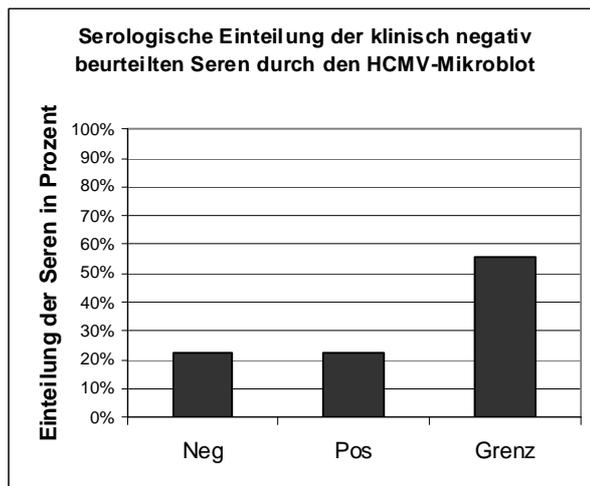
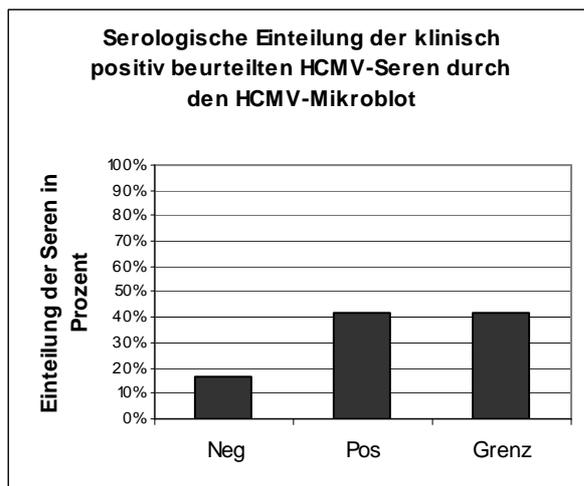


Diagramm 13 u. 14: Spezifitätstestung des HCMV-IgG-Mikroblots

Die Diagramme 13 und 14 stellen die serologische Einteilung der zwölf klinisch als HCMV-positiv und neun klinisch als HCMV-negativ beurteilten Seren in Prozent durch den HCMV-IgG-Mikroblot dar.

Neg = HCMV-negative Seren, Pos = HCMV-positive Seren, Grenz = HCMV grenzwertige Seren

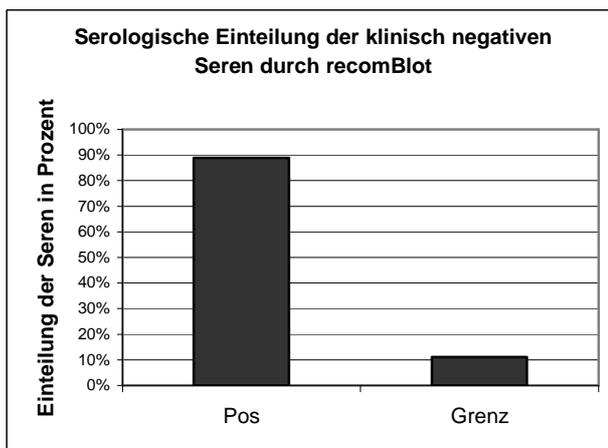
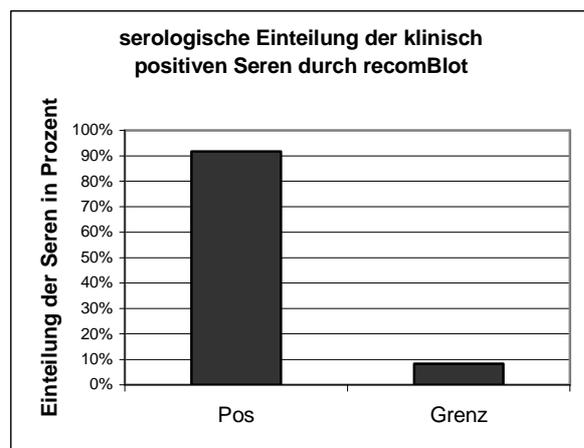


Diagramm 15 u. 16: Spezifitätstestung des HCMV IgG-recomBlots (Mikrogen, Neuried)

Die Diagramme 15 und 16 stellen die serologische Einteilung der zwölf klinisch als HCMV-positiv und neun klinisch als HCMV-negativ beurteilten Seren in Prozent durch den HCMV-IgG-recomBlot (Mikrogen, Neuried) dar.

Neg = HCMV-negative Seren, Pos = HCMV-positive Seren, Grenz = HCMV-grenzwertige Seren

3.2.5.1 Vergleich der antigenen Eigenschaften der HCMV-Antigene im IgG-Mikroblot

Die antigenen Eigenschaften der HCMV-Antigene wurden mit 30 HCMV positiven Patientenseren im Mikroblot getestet. In Tabelle 19 ist für jedes HCMV-Antigen die durchschnittliche Reaktivität mit den IgG-Antikörpern der 30 Patientenseren aufgeführt. Die Antikörper der 30 Patientenseren reagierten am häufigsten mit dem Antigen HCMV pp150 F2. Aber auch die Antigene HCMV pp150 F1 bzw. F3 und HCMV gB F3, sowie HCMV pp28 F2 wiesen gute antigenen Eigenschaften auf und stellen ein breites Panel an Antigenen zum Nachweis von HCMV-IgG-Antikörpern dar.

Tabelle 19: Zusammenfassung der durchschnittlichen Reaktivitäten der im HCMV-IgG-Mikroblot getesteten Antigene

Als Maß für die durchschnittliche Reaktivität der im HCMV-IgG-Mikroblot getesteten HCMV-Antigene wurden von den zehn HCMV-Antigenen die Mittelwerte der visuellen Färbungsgrade von 30 HCMV positiven Patientenseren gebildet. Am häufigsten reagierten die IgG-Antikörper der Seren mit dem Antigen HCMV pp150 F2.

HCMV = humanes Zytomegalovirus, g = Glykoprotein, F1, F2, F3 = Fragment 1, 2, 3

HCMV pp150 F1	HCMV pp150 F2	HCMV pp150 F3	HCMV gB F2	HCMV gB F3	HCMV pp65 F1	HCMV pp65 F2	HCMV pp28 F1	HCMV pp28 F2	HCMV pp52 F1
3,4	3,5	3,3	2,4	3,1	2,8	1,2	2,3	2,9	1,6

3.2.6 Sensitivitäts- und Spezifitätstestung des HHV6-Mikroblots

Für die Beurteilung der Sensitivität und Spezifität des HHV6-IgG-Mikroblots konnte kein Goldstandard definiert werden, da erhältliche serologische HHV6-Testsysteme, wie der in der Routinediagnostik eingesetzte Anti-HHV6-IgG-Immunfluoreszenztest (Euroimmun, Lübeck) falschnegative Ergebnisse oder Kreuzreaktionen zeigen. Um eine Aussage über die Qualität des HHV6-IgG-Mikroblots zu treffen, wurde dieser mit dem HHV6-IgG-IFT (Euroimmun, Lübeck) und dem HHV6-IgG-ELISA (Panbio, Rüsselsheim) verglichen. Nach Angaben der Hersteller werden im HHV6-IgG-IFT (Euroimmun, Lübeck) HHV6-A-Antigene und im HHV6-IgG-ELISA (Panbio, Rüsselsheim) HHV6-B-Antigene eingesetzt. Im HHV6-Mikroblot liegen fünf HHV6-A-Antigene und fünf HHV6-B-Antigene vor. Die Antigene wiesen nur lineare Epitope auf. Als serologisch positiv wurde ein Serum definiert, wenn mindestens eins von zehn Antigenen einen visuellen Färbungsgrad von 3 aufwies. Als grenzwertig wurde ein Serum definiert, wenn mindestens eins von zehn Antigenen einen visuellen Färbungsgrad von 2 aufwies. Wenn alle zehn Antigene keine Reaktion zeigten, wurde das Serum bezogen auf dieses Virus als serologisch negativ beurteilt.

Mit den drei diagnostischen HHV6-Testsystemen (HHV6-IgG-Mikroblot, HHV6-IgG-ELISA und dem HHV6-IgG-IFT) wurden 89 Testseren (30 Thrombozytenspender, 30 Eigenblutspender und 29 Kinderseren) beurteilt. Es konnten nur 29 Kinderseren mit den HHV6-Testsystemen untersucht werden, da die Menge zur Testung von allen drei Testsystemen für ein weiteres Kinderserum nicht ausreichend war. Der in Form eines Säulendiagramms (Diagramm 17) dargestellte Vergleich der drei serologischen HHV6-Testsysteme zeigt, dass der HHV6-Mikroblot mit dem HHV6-IgG-IFT in 79,8%, der HHV6-IgG-Mikroblot mit dem HHV6-IgG-ELISA in 64% und der HHV6-IgG-ELISA mit dem HHV6-IgG-IFT in 67,4% der getesteten 89 Patientenseren in den serologischen Aussagen übereinstimmt.

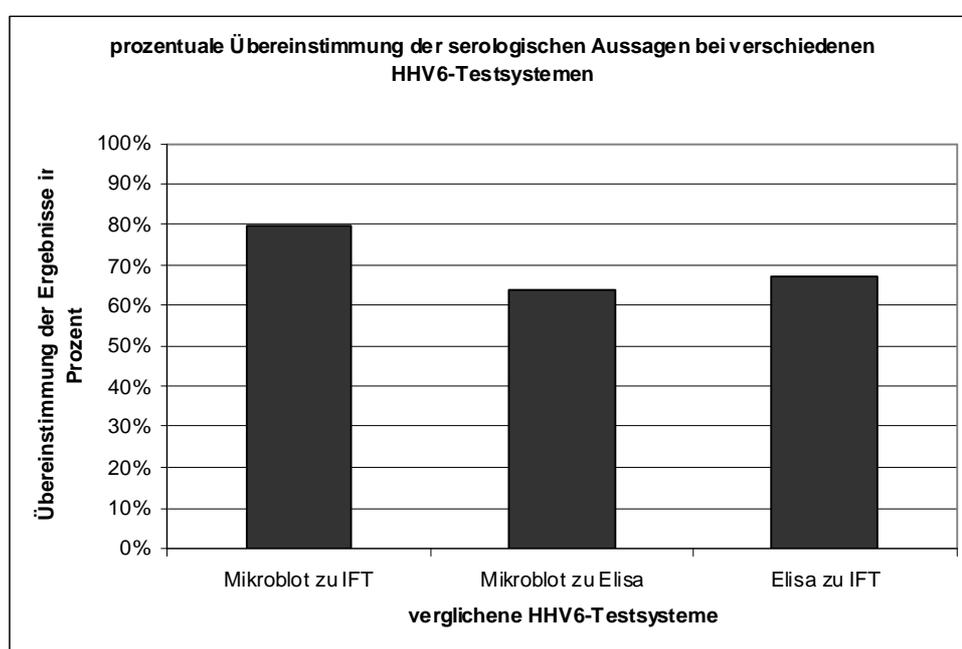


Diagramm 17: Vergleich der diagnostischen HHV6-Testsysteme (HHV6-IgG-Mikroblot, HHV6-IgG-ELISA und HHV6-IgG-IFT)

Das Diagramm 17 stellt einen Vergleich zwischen den 3 HHV6-Testsystem (HHV6-IgG-Mikroblot, HHV6-IgG-ELISA und HHV6-IgG-IFT) dar. Die Säulen geben, gemessen an den 89 Testseren (60 Erwachsenenseren und 29 Kinderseren) für jeweils zwei HHV6-Testsysteme prozentual die serologisch übereinstimmenden HHV6-Ergebnisse wieder. Der HHV6-IgG-Mikroblot wies mit dem HHV6-IgG-IFT (Euroimmun, Lübeck) die stärkste Übereinstimmung auf.

IFT = Immunfluoreszenztest, ELISA = Enzym-linked Immunosorbent Assay

Weiterhin konnte ermittelt werden, dass der HHV6-IgG-IFT (Euroimmun, Lübeck) mit 100% der Thrombozytenspender und 96,7% der Eigenblutspender einen hohen Prozentsatz als HHV6 positiv testete. Der HHV6-IgG-Mikroblot beurteilte wie der HHV6-IgG-IFT mit 96,7% der Thrombozytenspender und 83,3% der Eigenblutspender einen großen Prozentsatz der Erwachsenenseren als HHV6-positiv. Zwei von 60 Erwachsenenseren (3,3%) wurden mit

dem HHV6-IgG-Mikroblot als serologisch grenzwertig beurteilt. Diese Seren wurden nicht den HHV6-positiven Seren zugeordnet und nicht in die Berechnungen der HHV6-Prävalenzen einbezogen. Der HHV6-IgG-ELISA (Panbio, Rüsselsheim) hingegen wies im Vergleich zum HHV6-IgG-Mikroblot und dem HHV6-IgG-IFT (Euroimmun, Lübeck) mit nur 63,3% für die Thrombozytenspender und 70% für die Eigenblutspender eine geringere HHV6-Prävalenz bei den Erwachsenenseren nach.

Da die HHV6-Primärinfektion vor dem zweiten Lebensjahr erfolgt, sind Kinderseren wichtig für die Einschätzung von serologischen HHV6-Testsystemen. Von den 29 Kinderseren stammten 20 Seren von Kindern, die über zwei Jahre alt waren (Durchschnittsalter: 9,9 Jahre) und 9 Seren von Kindern, die unter zwei Jahre alt waren (Durchschnittsalter: 1 Jahr). Obwohl der HHV6-IgG-Mikroblot und der HHV6-IgG-IFT 70% der Kinderseren von Kindern über zwei Jahren als HHV6-positiv einstufte, wiesen sie in 45% der Ergebnisse Unterschiede auf. Der HHV6-IgG-ELISA wies ähnlich den Erwachsenenseren eine HHV6-Prävalenz von 55% auf. Bei den getesteten Kinderseren unter zwei Jahren wiesen der HHV6-IgG-IFT und der HHV6-IgG-ELISA mit 88,9% eine hohe Übereinstimmung der Ergebnisse auf. Der HHV6-IgG-Mikroblot hingegen zeigte mit nur 55% eine deutlich geringere Übereinstimmung der Ergebnisse mit dem HHV6-IgG-IFT und HHV6-IgG-ELISA, jedoch wies er für die Kinderseren eine HHV6-Prävalenz von 44,4% auf. Der HHV6-IgG-IFT stufte 33,3% der Seren von Kindern unter zwei Jahren als HHV6-positiv ein und der HHV6-IgG-ELISA 22,2%.

Tabelle 20: tabellarische Zusammenfassung der HHV6-Prävalenzen für die drei HHV6-Testsysteme sowie Zusammenfassung der serologisch übereinstimmenden Ergebnisse zwischen den HHV6-Testsystemen

In der Tabelle 20 wurden für die drei HHV6-Testsysteme (HHV6-IgG-Mikroblot, HHV6-IgG-IFT und HHV6-IgG-ELISA) die von 89 Testseren (30 Thrombozytenspender, 30 Eigenblutspender und 29 Kinderseren) ermittelten HHV6-Prävalenzen in Prozenten zusammengefasst. Außerdem wurden die beim Vergleich der HHV6-Testsysteme serologisch übereinstimmenden HHV6-Ergebnisse prozentual dargestellt.

	Serologische HHV6-Testsysteme	Kinder unter 2 Jahre n=9	Kinder über 2 Jahre n=20	Thrombozytenspender n=30	Eigenblutspender n=30
Positive Prävalenz	Mikroblot	44,4%	70%	96,7%	83,3%
	IFT	33,3%	70%	100%	96,7%
	ELISA	22,2%	55%	63,3%	70%
Übereinstimmungen	Mikroblot/ IFT	55,5%	55%	96,7%	83,3%
	Mikroblot/ ELISA	55,5%	70%	60%	66,7%
	IFT/ ELISA	88,9%	65%	63,3%	66,7%

3.2.6.1 Vergleich der antigenen Eigenschaften der HHV6-Fusionantigene im Mikrobloblot

Die antigenen Eigenschaften der HHV6-Antigene wurden mit 57 HHV6 positiven Seren im Mikrobloblot geprüft. Im Vergleich mit den HCMV-Antigenen reagierten die HHV6-Antigene durchschnittlich schwächer mit den IgG-Antikörpern der getesteten Seren. Das HHV6 B-U47-F6-Antigen reagierte am häufigsten mit den IgG-Antikörpern der Patientenseren (Tabelle 22). Aber auch die Antigene HHV6 A/ B pp100 F1 bzw. F2 weisen gute antigenen Eigenschaften auf. Die Mittelwerte der visuellen Färbungsgrade der Antigene verweisen darauf, dass die getesteten Seren mehr HHV6 B Antigen-spezifische als HHV6 A Antigen-spezifische IgG-Antikörper aufwiesen.

Tabelle 21: Zusammenfassung der durchschnittlichen Reaktivitäten der im HHV6-IgG-Mikrobloblot getesteten HHV6-Antigene

Als Maß für die durchschnittliche Reaktivität der im HHV6-IgG-Mikrobloblot getesteten HHV6-Antigene wurden von den zehn HHV6-Antigenen die Mittelwerte der visuellen Färbungsgrade von 30 getesteten Seren ermittelt. Am häufigsten reagierten die Antikörper der Seren mit dem Antigen HHV6 B U47 F6.

HHV6 = humanes Herpesvirus 6, g = Glykoprotein, F1, F2, F6 = Fragment 1, 2, 6

HHV6 A gB-F1	HHV6 B gB-F1	HHV6 A U47-F2	HHV6 B U47-F2	HHV6 A pp100-F1	HHV6 A pp100-F2	HHV6 B pp100-F1	HHV6 B pp100-F2	HHV6 A gL	HHV6 B U47-F6
1,4	1,4	1,7	2,1	1,9	2,4	2,7	2,0	2,0	3,2

3.2.6.2 Einfluss des Alters auf den HHV6-IgG-Antikörpertiter

Im Diagramm 18 ist eine negative Korrelation zwischen dem zunehmenden Alter der Patienten und der abnehmenden HHV6-Antigensumme gezeigt. In einer Korrelationsanalyse konnte eine negative lineare Korrelation zwischen dem zunehmenden Alter und der Abnahme der Antigensumme mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner 1% nachgewiesen werden. Der berechnete Korrelationskoeffizient nach Pearson liegt bei $r = -0,433$ und weist auf eine moderate Korrelation hin.

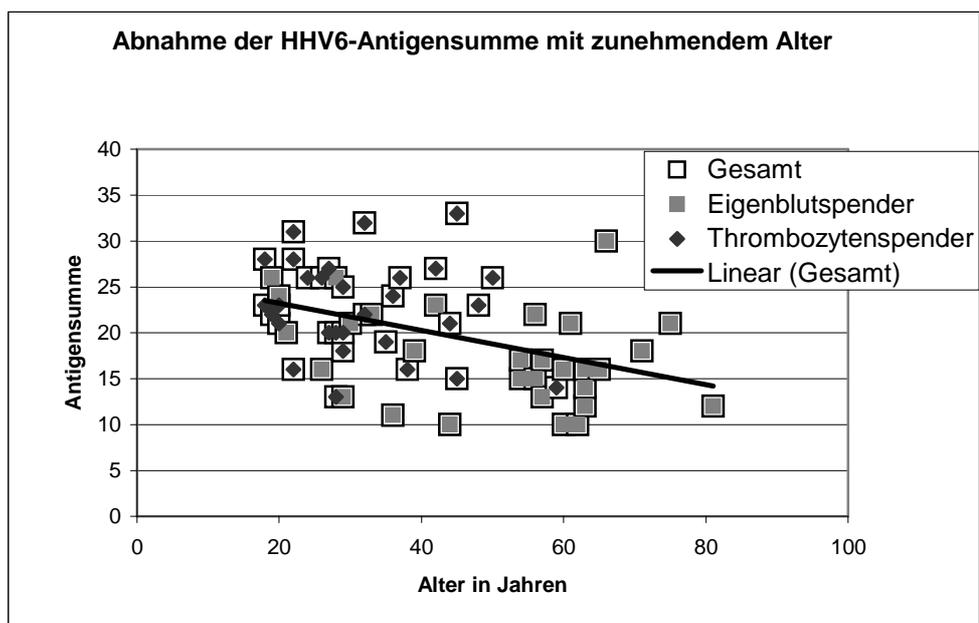


Diagramm 18: Entwicklung der HHV6-Antikörperantwort mit zunehmendem Alter

Im Diagramm 18 ist das Alter von 60 Patienten in Abhängigkeit der ermittelten HHV6-Antigensumme dargestellt, die ein Maß für die Konzentration an Antikörpern im Serum wiedergibt. Durch die dargestellte lineare Regressionskurve kann auf eine Korrelation verwiesen werden, die durch eine Korrelationsanalyse nach Pearson signifikant bestätigt wurde.

3.2.7 Beurteilung der Testseren mit dem HHV6-IgG-Mikroblot

In einer anschließenden Analyse wurden die Erwachsenenserum (Thrombozytenspender und Eigenblutspender) und die Kinderseren in monovalente HHV6 A- bzw. HHV6 B-Seren eingeteilt und diese von den polyvalenten HHV6-Seren unterschieden. Im HHV6-IgG-Mikroblot liegen fünf HHV6 A-Antigene und fünf HHV6 B-Antigene vor (Tabelle 21). Als HHV6 A- bzw. HHV6 B-monovalent wurden Seren mit dem HHV6-IgG-Mikroblot definiert, wenn diese entweder nur HHV6 A Antigen-spezifische IgG-Antikörper oder nur HHV6 B Antigen-spezifische IgG-Antikörper aufwiesen.

Tabelle 22: Zusammenfassung der im Mikroblob vorliegenden HHV6-Antigene

In der Tabelle 21 sind die HHV6-Antigene mit den Proteinsequenzen der entsprechenden Virusproteine zusammengefasst.

HHV6-A-Antigene	Aminosäuresequenz	Protein
HHV6 A-gB-F1	aa335-395	Glykoprotein B
HHV6 A-U47-F2	aa341-650	Membran sekretiertes Glykoprotein U47
HHV6 A-pp100-F1	aa295-576	Tegumentprotein pp100
HHV6 A-pp100-F2	aa569-852	Tegumentprotein pp100
HHV6-A-gL	aa12-242	Glykoprotein L
HHV6-B-Antigene	Aminosäuresequenz	Protein
HHV6 B-gB-F1	aa335-395	Glykoprotein B
HHV6 B-U47-F2	aa321-727	Membran sekretiertes Glykoprotein U47
HHV6 B-pp100-F1	aa281-614	Tegumentprotein pp100
HHV6 B-pp100-F2	aa581-839	Tegumentprotein pp100
HHV6 B-U47-F6	aa542-644	Membran sekretiertes Glykoprotein U47

Die HHV6 A- und HHV6 B-Antigene reagierten mit den Antikörpern der 90 Humansenen (30 Thrombozytenspender, 30 Eigenblutspender und 30 Kinderseren) in unterschiedlichen Mustern.

Im Diagramm 19 wird deutlich, dass 81,7% der 60 getesteten Erwachsenenseren (30 Thrombozytenspender und 30 Eigenblutspender, Durchschnittsalter 40,7 Jahre, mind. 18 Jahre, max. 81 Jahre) HHV6 A Antigen-spezifische und HHV6 B Antigen-spezifische IgG-Antikörper aufwiesen. Außerdem wird im Diagramm 19 deutlich, dass die HHV6 A-/ B-polyvalenten Erwachsenenseren mehr HHV6 B Antigen-spezifische IgG-Antikörper aufwiesen, was durch die Verschiebung des Antigen-spezifischen IgG-Antikörpermusters in Richtung der HHV6 B-Antigene sichtbar wird. Sieben (11,7%) der 60 Erwachsenenseren reagierten nur mit HHV6-B-Antigenen. Nur ein Serum (1,7%) der getesteten Erwachsenenseren war HHV6 A-monovalent und wies Reaktionen mit den HHV6 A U47 F2-, HHV6 A pp100 F2- und den HHV6 A gL-Antigenen auf. 5% der Erwachsenenseren wiesen keine IgG-Antikörper gegen die zu untersuchenden HHV6 A- und B-Antigene auf. Sie wurden mit dem HHV6-IgG-Mikroblob als serologisch HHV6-negativ beurteilt.

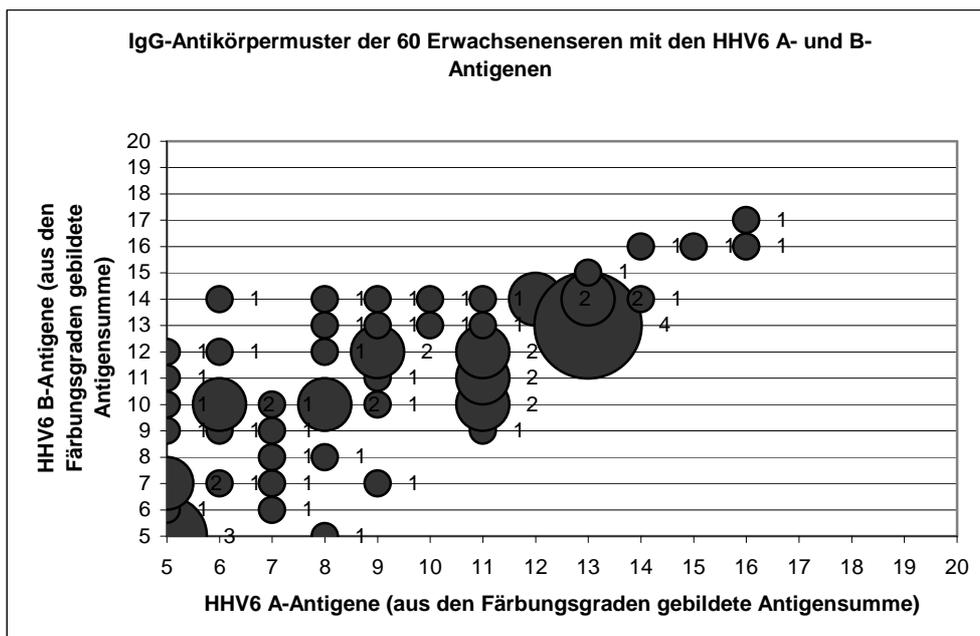


Diagramm 19: Antigen-spezifisches IgG-Antikörpermuster der 60 Erwachsenen seren mit den HHV6 A- und B-Antigenen

Im Diagramm 19 ist das Antigen-spezifische IgG-Antikörpermuster der 60 Erwachsenen seren (30 Thrombozytenspender und 30 Eigenblutspender, Durchschnittsalter 40,7 Jahre, min. 18 Jahre, max. 81 Jahre) mit den HHV6 A- und HHV6 B-Antigenen dargestellt, wobei für jedes Serum die Subtyp-spezifischen Antigensummen im Diagramm aufgetragen sind. Seren mit gleichen Subtyp-spezifischen Antigensummen werden durch die zunehmenden Kreisdurchmesser und durch die angegebene Zahl dargestellt. Das Diagramm 19 verdeutlicht, dass 81,7% der Erwachsenen seren (Thrombozytenspender und Eigenblutspender) HHV6 A-/B-polyvalent sind und häufiger Antikörper aufweisen, die mit den HHV6 B-Antigenen reagieren. Die deutlich geringere Anzahl monovalenter Seren ist häufiger HHV6 B subtypspezifisch.

Die eingeführte Einteilung der Kinderseren unter Punkt 3.2.6 in Seren von Kindern unter und über zwei Jahren wurde beibehalten. 60% der Seren von Kindern unter zwei Jahren (zwischen 10 und 16 Monate alt) wurden mit dem HHV6-Mikroblot als HHV6-negativ getestet (Diagramm 20). Drei Seren von Kindern unter zwei Jahren (2, 9 und 16 Monate alt) wurden als HHV6 B-monovalent beurteilt. Ein Kinderserum (10%, fast 15 Monate alt) wies IgG-Antikörper gegen HHV6 A- und HHV6 B-Antigene auf.

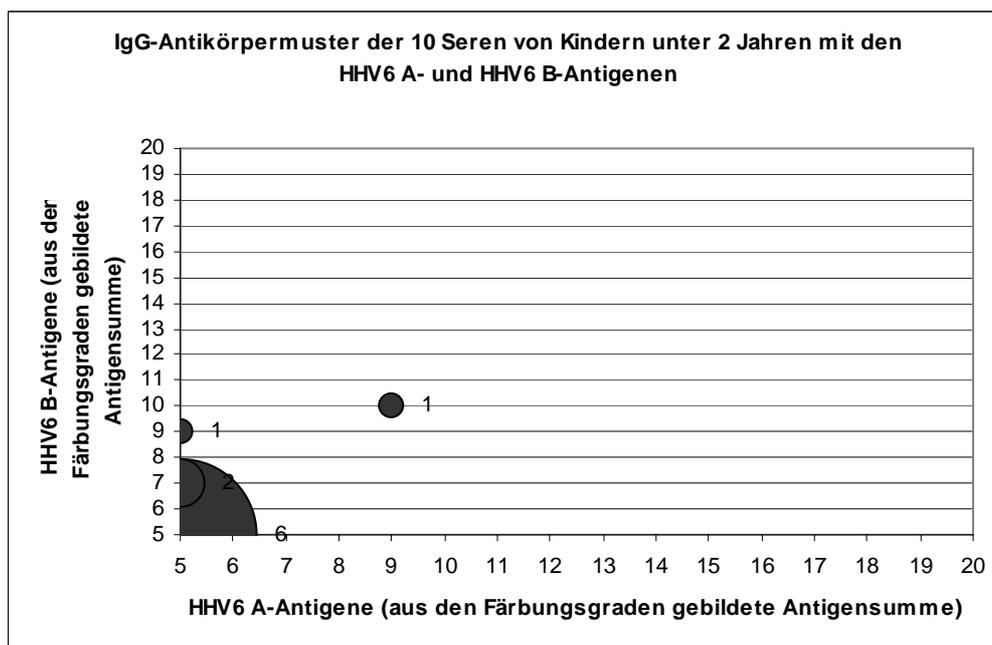


Diagramm 20: Antigen-spezifisches IgG-Antikörpermuster von zehn Kinderseren unter zwei Jahren mit den HHV6 A- und B-Antigenen

Im Diagramm 20 ist das Antigen-spezifische IgG-Antikörpermuster der zehn Seren von Kindern unter zwei Jahren (Durchschnittsalter 1 Jahr, mind. 2 Monate, max. 1,5 Jahre) mit den HHV6 A- und HHV6 B-Antigenen gezeigt, wobei für jedes Serum die Subtyp-spezifischen Antigensummen im Diagramm aufgetragen sind. Seren mit gleichen Subtyp-spezifischen Antigensummen werden durch die zunehmenden Kreisdurchmesser und durch die angegebene Zahl dargestellt. Neben den vielen HHV6-negativen Seren sind 75% der HHV6-positiven Seren HHV6 B-monovalent. Nur ein Serum ist HHV6 A-/ B-polyvalent.

Erwartungsgemäß fiel die mit dem HHV6-IgG-Mikroblot ermittelte HHV6-Durchseuchung der Seren von Kindern über zwei Jahren mit 70% HHV6-positiven Seren (14 Seren, Durchschnittsalter der Kinder 9,9 Jahre, mind. 3 Jahre, max. 18 Jahre) höher als bei den Kindern unter zwei Jahren (Diagramm 21) aus. Jeweils drei Kinderseren wurden als grenzwertig (15%, Durchschnittsalter 10,7 Jahre, mind. 8 Jahre, max. 14 Jahre) und als HHV6-negativ (15%, Durchschnittsalter der Kinder 9,3 Jahre, min. 4 Jahre, max. 13 Jahre) beurteilt. Mit 65% (13 Seren) waren deutlich mehr Seren von Kindern über zwei Jahren im Vergleich zu Kindern unter zwei Jahren HHV6 A-/ B-polyvalent. 20% (vier Seren, Durchschnittsalter der Kinder 9,5 Jahre, mind. 3 Jahre, max. 14 Jahre) der HHV6-positiven und -grenzwertigen Seren von Kindern über zwei Jahren wiesen nur IgG-Antikörper gegen die HHV6 B-Antigene auf. HHV6 A-monovalente Kinderseren wurden in beiden Altersgruppen der Kinder nicht gefunden. Wie für die Erwachsenenserum gezeigt, kann in den Diagrammen 20 und 21 auch für die Kinderseren eine Verschiebung der IgG-Antikörperantwort in Richtung der HHV6 B-Antigene gezeigt werden.

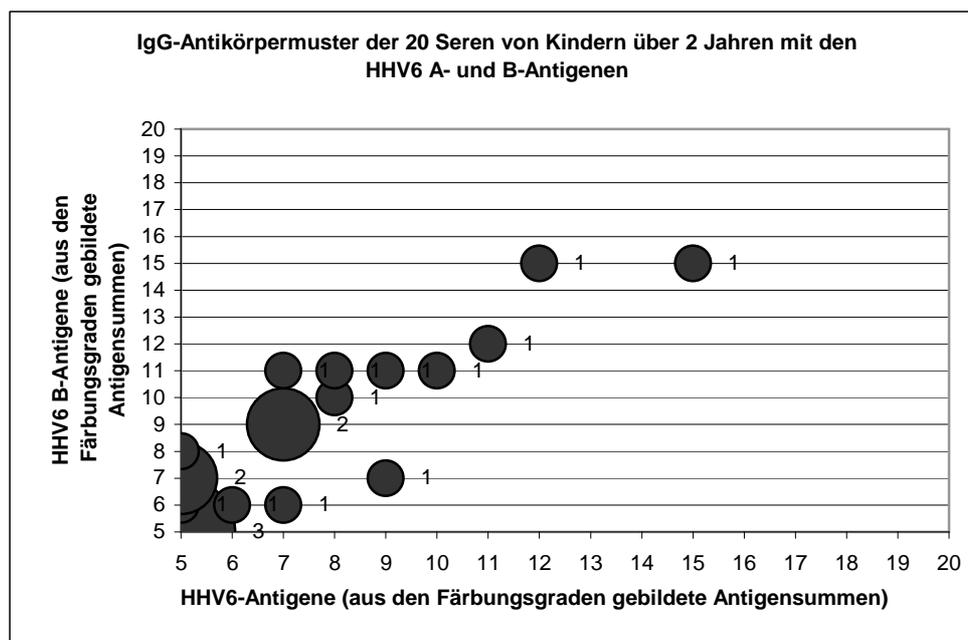


Diagramm 21: Antigen-spezifisches IgG-Antikörpermuster von 20 Kinderseren über zwei Jahren mit den HHV6 A- und B-Antigenen

Im Diagramm 21 ist das Antigen-spezifische IgG-Antikörpermuster der 20 Seren von Kindern über zwei Jahren (Durchschnittsalter 9,9 Jahre, mind. 3 Jahre, max. 18 Jahre) mit den HHV6 A- und HHV6 B-Antigenen dargestellt, wobei für jedes Serum die Subtyp-spezifischen Antigensummen im Diagramm aufgetragen sind. Seren mit gleichen Subtyp-spezifischen Antigensummen werden durch die zunehmenden Kreisdurchmesser und durch die angegebene Zahl dargestellt. Im Diagramm wird die Zunahme an HHV6 A-/ B-polyvalenten Seren bei Kindern über zwei Jahren deutlich. 65% der Kinderseren wiesen IgG-Antikörper gegen HHV6 A- und B-Antigene auf. Die mit 20% deutlich geringere Anzahl monovalenter Seren ist nur HHV6 B Subtyp-spezifisch.

3.2.8 Untersuchungen zur serologischen Unterscheidung der HHV6-positiven Seren

Die serologische Unterscheidung der positiven HHV6-Seren in HHV6 A-monovalente bzw. HHV6 B-monovalente Seren ist mit den kommerziell erhältlichen serologischen Testsystemen nicht möglich. Um zwischen HHV6 A- und B-positiven Seren zu unterscheiden, wurden Subtyp-spezifische HHV6-Antigene exprimiert. Wie unter Punkt 3.1.1 beschrieben, wurden von den HHV6-Subtypen Sequenzbereiche von homologen Strukturproteinen ausgewählt, die als antigen beschrieben sind und Sequenzunterschiede aufweisen. Diese ausgewählten Sequenzbereiche der homologen Strukturproteine (Glykoprotein B, Tegumentprotein pp100 und Glykoprotein U47) wurden als Fusionsproteine exprimiert. Im HHV6-Mikroblot liegen fünf HHV6 A-Antigene und fünf HHV6 B-Antigene vor. Die Antigene besitzen nur lineare Epitope und sind nicht glykosyliert. Vier der fünf HHV6 A-Antigene (HHV6 A-gB-F1, HHV6 A-U47-F2, HHV6 A-pp100-F1 und HHV6 A-pp100-F2)

weisen homologe Proteinsequenzen zu vier der fünf HHV6 B-Antigene (HHV6 B-gB-F1, HHV6 B-U47-F2, HHV6 B-pp100-F1 und HHV6 B-pp100-F2) auf (Tabelle 23).

Tabelle 23: Zusammenfassung der homologen vier HHV6 Antigenpaare mit dem Prozentsatz an identischen Aminosäuren

Antigene		Prozentsatz der identischen Aminosäuren
HHV6 A gB F1	HHV6 B gB F1	90%
HHV6 A U47 F2	HHV6 B U47 F2	83%
HHV6 A pp100 F1	HHV6 B pp100 F1	76%
HHV6 A pp100 F2	HHV6 B pp100 F2	81%

3.2.8.1 Vergleich der IgG-Antikörperreaktionen mit den homologen HHV6-Antigenen

Die Spezifität der homologen HHV6 A- bzw. B-Antigene (Tabelle 23) wurde mit Hilfe von 90 humanen Testseren (30 Thrombozytenspender, 30 Eigenblutspender und 30 Kinderseren) untersucht. Die Antigen-spezifischen IgG-Antikörpermuster der Testseren mit den homologen HHV6 A- und B-Antigenpaaren sind in den Diagrammen 22 bis 25 dargestellt. Im Diagramm 22 ist das Antigen-spezifische IgG-Antikörpermuster der 90 Testseren mit dem homologen Antigenpaar HHV6 A gB F1 und HHV6 B gB F1 zu sehen. Trotzdem die Antigene HHV6 A gB F1 und HHV6 B gB F1 zu 90% identische Aminosäuren aufweisen, reagierten 7,7% der Testseren (7 Seren) spezifisch nur mit dem HHV6 B gB F1-Antigen. Dagegen reagierten 4,4% der Testseren (4 Seren) allein nur mit dem HHV6 A gB-F1 Antigen. 13 Testseren (14,4%) wiesen Antikörper auf, die mit beiden Antigenen reagierten. 73,3% der Testseren zeigten keine Reaktion mit einem der HHV6 A bzw. B gB F1-Antigene.

Im Diagramm 23 ist das Antigen-spezifische IgG-Antikörpermuster der 90 Testseren mit den homologen Antigenen HHV6 A U47 F2 und HHV6 B U47 F2 gezeigt. Sie weisen 83% an identischen Aminosäuren auf. Da mit 33,3% der Testseren über 15% mehr an Seren mit den Antigenen HHV6 A U47 F2 und HHV6 B U47 F2 reagierten, sind diese HHV6-Antigene deutlich antigenener als die homologen HHV 6 A- bzw. B gB-F1-Antigene. Insgesamt 45,6% der Testseren wiesen keine IgG-Antikörper gegen die HHV6 A- bzw. B-U47 F2 Antigene auf. Wie bereits unter Punkt 3.2.7 gezeigt, reagierten die Testseren deutlich stärker mit den HHV6 B-Antigenen. Das wird durch die Beobachtung gestützt, dass mit 15,6% mehr Testseren allein nur mit dem HHV6 B U47 F2-Antigen reagierten, wohingegen nur 5,6% Testseren allein nur mit dem HHV6 A U47 F2-Antigen (5,6%) reagierten.

In den Diagrammen 24 und 25 sind die Antigen-spezifischen IgG-Antikörpermuster der 90 Testseren mit den homologen Antigenpaaren HHV6 A pp100 F1 und HHV6 B pp100 F1, sowie HHV6 A pp100 F2 und HHV6 B pp100 F2 dargestellt. Die Antigene HHV6 A pp100 F1

und HHV6 B pp100 F1 weisen mit 76% identischer Aminosäuren weniger homologe Bereiche auf, als die Antigene HHV6 A pp100 F2 und HHV6 B pp100 F2 (81% identische Aminosäuren). Mit 45,5% reagierten vergleichsweise mehr Testseren mit den HHV6 A- und B-pp100 F2-Antigenen, mit den HHV6 A pp100 F2 und HHV6 B pp100 F2-Antigenen dagegen nur 36,6%. Die stark antigenen Eigenschaften des HHV6 B pp100 F1-Antigens werden im Diagramm 24 durch die Verschiebung der IgG-Antikörperantwort in Richtung des HHV6 B pp100-F1-Antigens sichtbar. 35,5% der Testseren reagierten spezifisch nur mit dem HHV6 B pp100 F1-Antigen. Nur ein Testserum (1,1%) wies IgG-Antikörper auf, die allein nur mit dem HHV6 A pp100 F1-Antigen reagierten. Der Vergleich der Diagramme 24 und 25 zeigt, dass die Testseren nicht – wie möglicherweise zu vermuten - stärker mit dem HHV6 B pp100 F2-Antigen reagierten, sondern häufiger mit dem HHV6 A pp100 F2-Antigen. 10% der Testseren wiesen Antikörper auf, die allein nur mit dem subtypspezifischen HHV6 A pp100 F2-Antigen reagierten. Dagegen reagierte kein Testserum allein nur mit dem Antigen HHV6 B pp100 F2. 44,4% der 90 Testseren zeigten keine Reaktionen mit den Antigenen HHV6 A pp100 F2 und HHV6 B pp 100 F2. Im Vergleich zeigten nur 26,6% der 90 Testseren mit dem HHV6 A/ B pp100 F1-Antigenpaar keine Reaktion.

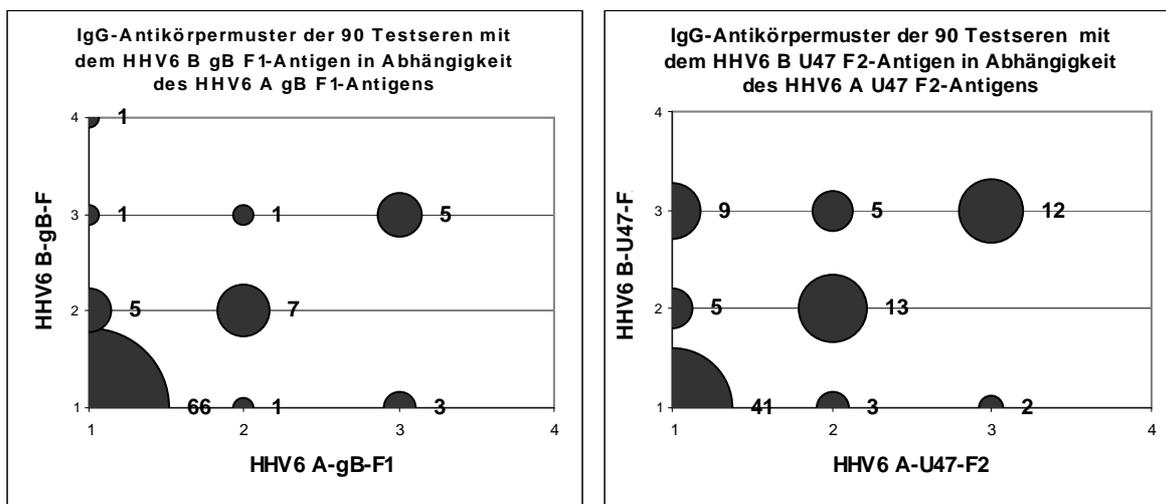


Diagramm 22 u. 23: Antigen-spezifisches IgG Antikörpermuster der 90 Testseren mit den homologen HHV6 A/ B gB F1- und HHV6 A/B U47 F2-Antigenpaaren

Im Diagramm 22 ist das Antigen-spezifische IgG-Antikörpermuster der 90 Testseren (30 Thrombozytenspender, 30 Eigenblutspender und 30 Kinderseren) mit den Antigenen HHV6 A gB F1 und HHV6 B gB F1 gezeigt. Im Diagramm 23 ist das Antigen-spezifische IgG-Antikörpermuster der gleichen 90 Testseren mit den Antigenen HHV6 A U47 F2 und HHV6 B U47 F2 dargestellt. An den X- u. Y-Achsen ist der visuelle Färbungsgrad als Maß für die Reaktivität aufgetragen. Gleiche visuelle Färbungsgradpaare unterschiedlicher Seren werden durch die zunehmenden Kreisdurchmesser und durch die angegebene Zahl verdeutlicht. Die Diagramme verweisen auf spezifische Reaktionen der Testseren mit den Antigenpaaren.

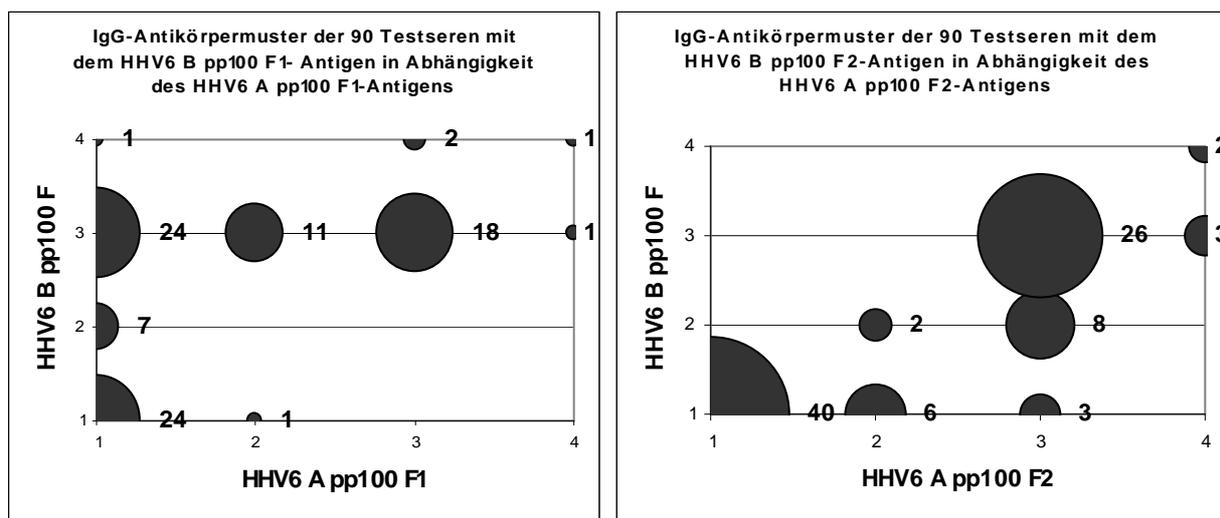


Diagramm 24 u. 25: Antigen-spezifisches IgG-Antikörpermuster der 90 Testseren mit den HHV6 A/ B pp100 F1 und HHV6 A/ B pp100 F2- Antigenpaaren

Im Diagramm 24 ist das Antigen-spezifische IgG-Antikörpermuster der 90 Testseren (30 Thrombozytenspender, 30 Eigenblutspender und 30 Kinderseren) mit den Antigenen HHV6 A pp100 F1 und HHV6 B pp100 F1 gezeigt. Im Diagramm 25 ist das Antigen-spezifische IgG-Antikörpermuster der gleichen 90 Testseren mit den Antigenen HHV6 A pp100 F2 und des HHV6 B pp100 F2 dargestellt. An den X- u. Y-Achsen ist der visuelle Färbungsgrad als Maß für die Reaktivität aufgetragen. Gleiche visuelle Färbungsgradpaare unterschiedlicher Seren wurden durch die zunehmenden Kreisdurchmesser und durch die angegebene Zahl verdeutlicht. Der Vergleich der Diagramme 24 und 25 sowie der Diagramme 22 und 23 weist auf die starken antigenen Eigenschaften des HHV6 B pp100 F1-Antigens hin. 35,5% der Testseren reagierten allein nur mit dem Antigen HHV6 B pp100 F1, wohingegen allein nur mit dem Antigen HHV6 B pp100 F2 kein Testserum reagierte. 45,5% der Testseren wiesen IgG-Antikörper sowohl gegen das Antigen HHV6 A pp100 F2 als auch gegen das Antigen HHV6 B pp100 F2 auf.

3.2.8.2 Algorithmus zur serologischen Unterscheidung der HHV6-Seren

Mit dem HHV6-IgG-Mikroblot können HHV6-Seren identifiziert werden, die nur Antikörper gegen die Antigene eines HHV6-Subtypen aufweisen. Diese Seren werden als monovalente HHV6 A- oder B-Seren bezeichnet. HHV6-Seren, die Antikörper gegen beide subtypspezifischen HHV6-Antigene aufweisen, werden als polyvalente HHV6-Seren beurteilt. Des Weiteren kann bei vielen polyvalenten HHV6-Seren eine Predominanz für den HHV6 B-Subtypen beobachtet werden. Als HHV6 B-predominant wird ein Serum definiert, wenn die Antigensummen der vier HHV6 B-spezifischen Antigene um mindestens drei Summenstufen größer sind als die Antigensummen der HHV6 A-spezifischen Antigene und wenn mindestens zwei HHV6 B-spezifische Antigene mit den Antikörpern des Serums reagieren.

3.3 Antikörperkinetiken nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation

3.3.1 Entwicklung der HCMV spezifischen IgG-Antikörperantwort nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSZT)

Über einen Zeitraum von 1 bis 270 Tagen (+251/-156 Tagen) nach der hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSZT) wurde mit dem HCMV-IgG-Mikroblot die Entwicklung der HCMV-IgG-Antikörperantwort von 22 Patienten dokumentiert. Alle 22 Patienten waren vor der HSZT HCMV-positiv und wurden auf Grund der Spenderprävalenz in zwei Gruppen untergliedert. Zehn Patienten erhielten die Blutstammzellen von HCMV-negativen Spendern. Zwölf weitere Patienten hingegen erhielten die Blutstammzellen von HCMV-positiven Spendern und wurden daher der Gruppe zwei zugeordnet. Pro Patient wurden über den Zeitraum von 150 Tagen von mindestens drei Seren bzw. Plasmen die HCMV-Antigensummen als Maß für die Antikörpertiter der Seren bzw. Plasmen bestimmt, wobei 69 bis 5 Tage vor der HSZT von jedem Patienten die HCMV-Antigensumme als Ausgangswert ermittelt wurde. Auf Grund der unter den Punkten 3.2.4.1 und 3.2.4.2 beschriebenen Streuung der Antigensummen bei wiederholter Testung der Seren mussten Grenzwerte definiert werden, ab welcher Summendifferenz zwischen zwei Antigensummen von einem HCMV-Antikörpertiteranstieg bzw. -abfall gesprochen werden kann bzw. welche Summendifferenzen auf die methodenbedingte Streuung der Antigensummen zurückzuführen sind. Da die Summendifferenzen der an einem Tag wiederholt ermittelten Antigensummen sowie der an zwei verschiedenen Tagen wiederholt ermittelten Antigensummen nach dem Kolmogorov-Smirnow-Test nicht von der Normalverteilung abweichen ($p=0,285$, $\alpha=0,05$ und $p=0,928$, $\alpha=0,05$), wurden nur die Summendifferenzen als wirkliche Antikörperanstiege bzw. abnahmen beurteilt, die außerhalb der Glockenkurvenfläche der aus der durch die Wiederholungsversuche der Summendifferenzen gebildeten Normalverteilung lagen. Die Grenzwerte berechneten sich daher aus dem Mittelwert der wiederholt gemessenen Summendifferenzen plus oder minus 3mal der Standardabweichung. Bei einem Vergleich von zwei Antigensummen, die an einem Tag im gleichen Reaktionsansatz bzw. die an zwei verschiedenen Tagen ermittelt wurden, wurde ab einer Summendifferenz von fünf bzw. zehn von einem realen Antikörpertiteranstieg bzw. -abfall gesprochen.

Mit dem HCMV-IgG-Mikroblot kann neben der IgG-Antikörperkinetik auch differenziert die HCMV Antigen-spezifischen IgG-Antikörperreaktionen untersucht werden. In den Tabellen 27 und 28 sind die IgG-Antikörperverläufe der 22 Patienten zusammengefasst. Neun von zehn Patienten (90%) der Gruppe 1 (Spender HCMV-negativ, Empfänger HCMV-positiv) wiesen nach der HSZT mindestens einmal eine positive HCMV-PCR auf. Dagegen

zeigten nur 50% der Patienten (sechs Patienten) der Gruppe 2 (Spender HCMV-positiv, Empfänger HCMV-positiv) in dem Zeitraum nach der HSZT mindestens einmal eine positive HCMV-PCR. Nur drei von zehn Patienten der Gruppe 1 mit gezeigter positiver HCMV-PCR wiesen 106, 182 sowie 283 Tage nach der HSZT einen Anstieg der HCMV-Antigensummen als Maß für den Antikörpertiteranstieg auf. Mit 58,3% (sieben der zwölf Patienten) zeigten deutlich mehr Patienten der Gruppe 2 83, 86, 145, 157, 161 sowie 186 Tage nach der HSZT einen Anstieg des HCMV-Antikörpertiters, wobei nur für vier dieser Patienten eine positive HCMV-PCR nachgewiesen werden konnte.

Weiterhin konnte bei vier von 10 Patienten der Gruppe 1 und bei drei von zwölf Patienten der Gruppe 2 trotz stabilen oder abfallenden Antikörpertiter eine Zunahme einzelner HCMV Antigen-spezifischer IgG-Antikörperreaktionen beobachtet werden (Tabelle 22). Des Weiteren konnte man oft vor oder während des Antikörperanstieges die Zunahme von HCMV pp52 F1 Antigen-spezifischen IgG-Antikörperreaktionen beobachten (Tabelle 22).

Ein Wechsel der HCMV Antigen-spezifischen IgG-Antikörper konnte bei drei von 10 Patienten der Gruppe 1 182, 204 und 283 Tage nach der HSZT beobachtet werden. Der Wechsel des IgG-Antikörpermusters wurde durch die Zunahme von einzelnen HCMV Antigen-spezifischen IgG-Antikörperreaktionen bei gleichzeitiger Abnahme anderer Antigen-spezifischer IgG-Antikörperreaktionen sichtbar.

Keine sichtbaren Hinweise für eine serologische Antwort auf eine HCMV-Reaktivierung konnten dagegen bei drei Patienten der Gruppe 1 beobachtet werden. Trotz gezeigter HCMV-PCR als Indikator für eine HCMV-Reaktivierung im Zeitraum 47 bis 60 Tage, 36 bis 199 Tage sowie 54 bis 104 Tage nach der HSZT konnte bis zum Ende der Beobachtungszeit 179, 206 und 147 Tage nach der HSZT kein Antikörperanstieg gemessen oder zunehmende Reaktivitäten einzelner Antigene beobachtet werden.

Tabelle 24: Zusammenfassung der IgG-Antikörperentwicklung nach HSZT bei HCMV negativem Transplantatspender

In Tabelle 27 sind von zehn Patienten mit negativem HCMV-Blutstammzellspender die Anstiege oder Abfälle der HCMV-IgG-Antikörpertiter, der Nachweis von einzelnen Antigen-spezifischen IgG-Antikörperreaktionen und der Nachweis von frühen IgG-Antikörpern zusammengefasst. Der Nachweis von einzelnen Antigenen wurde in der Tabelle nur dokumentiert, wenn der Färbungsgrad einzelner Antigene um mindestens 2 Grad zum vorhergehenden Tag zugenommen hatte.

Empfänger HCMV-positiv, Spender HCMV-negativ (n = 10)						
	Tage nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation					
Patienten	Positive HCMV-PCR	HCMV-Antikörper-anstieg	HCMV-Antikörper-abfall	Zunehmende Färbungsgrade einzelner Antigene	Nachweis von HCMV pp 52 F1-Antikörpern	Beobachtungszeitraum
1	44-56	106	-----	57	-----	371
2	34-55, 86-97	-----	133	-----	58	133
3	47-60	-----	179	-----	-----	179
4	-----	-----	-----	-----	268	268
5	58-94	-----	-----	192	-----	461
6	29-70, 136-255, 455	182	-----	182	182, 511	511
7	50, 65, 152-216	-----	204	204	224	224
8	34-69, 134, 183- 199	-----	82	-----	-----	206
9	54, 104	-----	90	-----	-----	147
10	38-94, 147, 255- 405	283	-----	389	-----	489

Tabelle 25: Zusammenfassung der IgG-Antikörperentwicklung nach HSZT bei HCMV positivem Transplantatspender

In Tabelle 28 sind von zwölf Patienten mit positivem HCMV-Blutstammzellspender die Anstiege oder Abfälle der HCMV-IgG-Antikörpertiter, der Nachweis von einzelnen Antigen-spezifischen IgG-Antikörperreaktionen und der Nachweis von frühen IgG-Antikörpern zusammengefasst. Der Nachweis von einzelnen Antigenen wurde in der Tabelle nur dokumentiert, wenn der Färbungsgrad einzelner Antigene um mindestens 2 Grad zum vorhergehenden Tag zugenommen hatte.

Empfänger HCMV-positiv, Spender HCMV-positiv (n = 12)						
Patienten	Tage nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation					
	Positive HCMV-PCR	HCMV-Antikörperanstieg	HCMV-Antikörperabfall	Zunehmende Färbungsgrade einzelner Antigene	Nachweis von HCMV pp 52 F1-Antikörpern	Beobachtungszeitraum
1	-----	161	-----	161, 359	-----	521
2	57-73, 188	-----	296	296	-----	296
3	48-64	-----	145	68	-----	145
4	-----	-----	-----	-----	-----	138
5	-----	86	-----	86	86	114
6	-----	-----	376	-----	-----	376
7	48-76	83	148	83	83	272
8	-----	-----	-----	182	-----	293
9	114-124	157	262	157	98	313
10	-----	161	-----	161	273	273
11	11-39, 96-106	186	106	189	-----	189
12	49-145	145	71	145	-----	145

3.3.2 Entwicklung der HHV6 spezifischen IgG-Antikörperantwort nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSZT)

Über einen Zeitraum bis zu 150 Tage (+/- 36 Tage) nach der hämatopoetischen Stammzelltransplantation wurde mit dem HHV6-IgG-Mikroblot die Entwicklung der HHV6-Antikörperantworten von 17 Patienten mit und ohne gezeigter HHV6-Reaktivierung dokumentiert (Tabelle 24). Pro Patient wurden über diesen Zeitraum von mindestens drei Seren bzw. Plasmen die HHV6-Antigensummen als ein Maß für den HHV6-IgG-Antikörpertiter der Seren bzw. Plasmen bestimmt, wobei 51 bis 5 Tage vor der hämatopoetischen Stammzelltransplantation von jedem Patienten die HHV6-Antigensumme

als Ausgangswert ermittelt wurde. Der Anstieg oder Abfall des HHV6-IgG-Antikörpertiters wurde wie unter 3.3.1 beschrieben durch die Zunahme oder Abnahme der HHV6-Antigensummen gezeigt. Um zu unterscheiden, welche Summendifferenzen einen realen Antikörperanstieg darstellen bzw. welche durch eine methodenbedingte Streuung der Antigensummen verursacht sind, wurden wie unter Punkt 3.3.1 Grenzwerte definiert. Zur Berechnung der Grenzwerte wurden die Summendifferenzen erst auf eine Nichtabweichung von der Normalverteilung geprüft. Da die Summendifferenzen der an einem Tag wiederholt ermittelten Antigensummen sowie der an zwei verschiedenen Tagen wiederholt ermittelten Antigensummen nach dem Kolmogorov-Smirnow-Test nicht von der Normalverteilung abweichen ($p=0,570$, $\alpha=0,05$ und $p=0,732$, $\alpha=0,05$), wurden die Grenzwerte für einen realen Antikörperanstieg bzw. -abfall aus dem Mittelwert der Summendifferenzen plus 3mal der Standardabweichung der Summendifferenzen berechnet. Bei einem Vergleich von zwei Antigensummen, die an einem Tag im gleichen Reaktionsansatz bzw. die an zwei verschiedenen Tagen ermittelt wurden, wurde ab einer Summendifferenz von fünf bzw. neun von einem realen Antikörperanstieg oder -abfall gesprochen.

Für sechs der 17 untersuchten Patienten (37,5%) konnte 15-54 Tage nach der hämatopoetischen Stammzelltransplantation durch einen positiven HHV6-PCR-Nachweis molekulargenetisch eine HHV6-Reaktivierung gezeigt werden. Drei der sechs Patienten (50%) mit einer gezeigten positiven HHV6-PCR wiesen 61, 86 sowie 182 Tage nach der hämatopoetischen Stammzelltransplantation und 7, 71 sowie 148 Tage nach der positiven HHV6-PCR einen mit dem HHV6-IgG-Mikroblot dokumentierten IgG-Antikörperanstieg auf. Es wurden drei HHV6 A/ B-Reaktivierungen dokumentiert, wobei zwei der drei Antikörperanstiege durch eine deutliche Mehrheit an nachgewiesenen HHV6 B Antigen-spezifischen IgG-Antikörpern gekennzeichnet waren. Ein anderer Patient (17%) mit gezeigter positiver HHV6-PCR wies einen Abfall der HHV6-IgG-Antikörper auf. Zwei weitere Patienten (33%) mit einer dokumentierten positiven HHV6-PCR zeigten über den Zeitraum von 150 Tagen keinen messbaren HHV6-Antikörperanstieg oder -abfall.

Für 64,7% der Patienten (elf Patienten) konnte über den Zeitraum von 150 Tagen nach der hämatopoetischen Stammzelltransplantation keine positive HHV6-PCR nachgewiesen werden. Vier der elf Patienten (36,4%) wiesen trotz fehlender positiver HHV6-PCR an den Tagen 36, 57, 79 und 90 nach der hämatopoetischen Stammzelltransplantation einen HHV6-IgG-Antikörperanstieg auf. Alle vier Patienten zeigten serologisch eine HHV6 A/ B-Reaktivierung, wobei zwei der vier Antikörperverläufe erneut durch eine deutliche Mehrheit an HHV6 B Antigen-spezifischen IgG-Antikörpern gekennzeichnet waren. Einen Abfall des HHV6-IgG-Antikörpertiters wurde bei drei weiteren Patienten (30%), die keine positive HHV6-PCR aufwiesen, beobachtet. Weitere vier von elf Patienten, für die keine positive HHV6-PCR gezeigt wurde, wiesen einen gleichbleibenden HHV6 IgG-Antikörperspiegel auf.

Alle sieben IgG-Antikörperverläufe, die durch einen HHV6 IgG-Antikörperanstieg gekennzeichnet waren, wiesen unabhängig vom HHV6-PCR-Nachweis eine ähnliche HHV6-IgG-Antikörperkinetik auf. Nach einem kurzen Anstieg des HHV6 IgG-Antikörpertiters folgte immer ein Abfall des HHV6 IgG-Antikörpertiters (Diagramm 26), wobei die Anstiege und Abfälle der IgG-Antikörpertiter unterschiedlich stark ausfielen. Einen zweiten Anstieg des HHV6 IgG-Antikörpertiters, wie er bei den HCMV-Antikörperkinetiken beobachtet werden konnte, wurde nicht dokumentiert.

Tabelle 26: Zusammenfassung der HHV6-IgG-Antikörperverläufe innerhalb der 150 Tage nach der hämatopoetischen Stammzelltransplantation

Patienten	Tage nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation			
	Positive HHV6-PCR	HHV6-Antikörperanstieg	HHV6 Antikörperabfall	Beobachtungszeitraum
1	-----	-----	-----	484
2	-----	57	-----	167
3	-----	-----	133	133
4	-----	79	164	164
5	34	182	399	511
6	-----	36	133	224
7	-----	90	-----	147
8	24, 28	-----	-----	489
9	25, 33	-----	18	164
10	-----	-----	-----	521
11	-----	-----	145	145
12	54	61	-----	138
13	15	86	-----	114
14	-----	-----	-----	376
15	23	-----	-----	293
16	-----	-----	-----	189
17	-----	-----	71	145

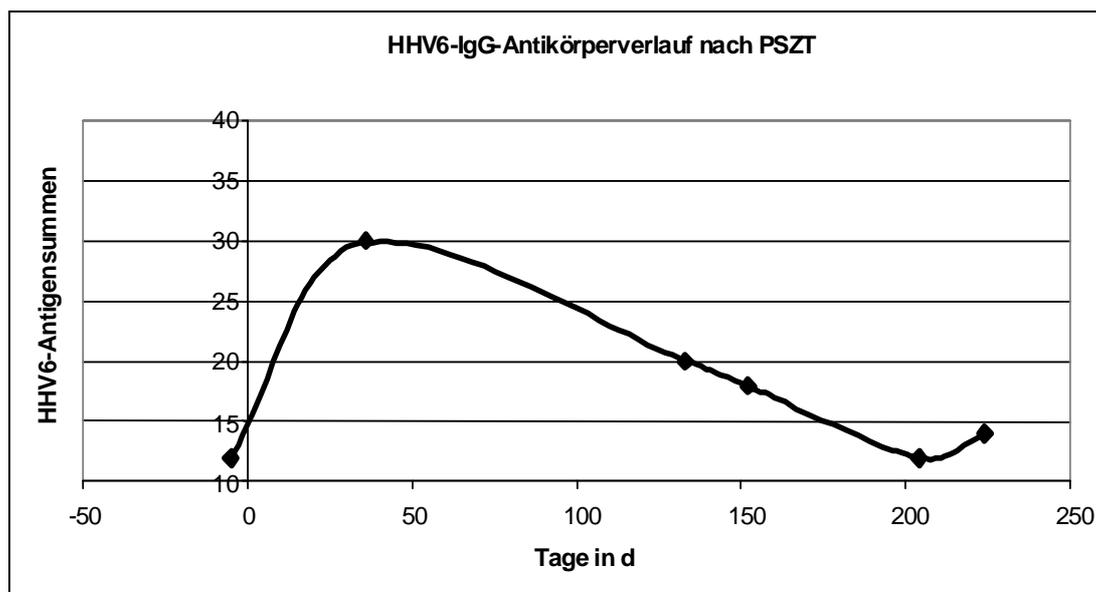


Diagramm 26: IgG-Antikörperentwicklung nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation

Diagramm 26 zeigt einen typischen mit dem HHV6-IgG-Mikroblot dokumentierten HHV6-IgG-Antikörperverlauf nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation. Die Antigensummen wurden aus den ermittelten visuellen Färbungsgraden der Antigenbanden gebildet und sind ein Maß für die IgG-Antikörpertiter im Serum.

4. Diskussion

4.1 Probleme der heterologen Proteinexpression

Insgesamt 60 Fusionsproteine wurden mit unterschiedlichem Erfolg exprimiert. Obwohl die Expressionsvektoren ein richtiges Leseraster aufwiesen, konnten einige Fusionsproteine gar nicht sowie andere nur schwach exprimiert werden. Die Ursachen dafür sind vielfältig. Die Fusionsproteine wiesen möglicherweise biochemische oder molekularbiologische Eigenschaften auf, die einen negativen Einfluss auf den Stoffwechsel und damit auf die Replikation oder das Wachstum der BL21-Bakterien genommen haben. Es könnte auch sein, dass einige Fusionsproteine Eigenschaften aufwiesen, die auf die BL21-Bakterien toxisch wirkten. Toxische Proteine inhibieren z.B. die Proteinsynthese [110], in dem sie die Ribosomenfunktion hemmen. Oft haben die für das Bakterium toxischen Proteine Funktionen als Membranproteine, Nucleasen oder cytoplasmatische Proteine. Außerdem kann die Überexpression von nichttoxischen Proteinen zur nicht korrekten Faltung der Proteine und zur Transkription von Hitzeschockgenen [111] sowie zur Expression von Stressgenen [112-114] führen. Die Proteinsynthese der zelleigenen Proteine und damit auch der Wirtsstoffwechsel der Bakterienzelle werden reduziert sowie an die Expression der heterologen Proteine angepasst. Die nicht korrekte Faltung der heterologen Proteine endet entweder in der Proteolyse der Proteine [115] oder in der Akkumulation der Proteine in unlöslicher Form in Einschlusskörperchen [116]. Die massive Akkumulation der überexprimierten nichttoxischen Proteine in der Bakterienzelle kann zu einer Wachstumshemmung führen [117]. Der von Borsig et al. (1997) gezeigte negative Einfluss des His-Tags auf die Expressionsrate verweist auf den His-Tag als eine weitere mögliche Ursache für die schlechte Expression einiger Fusionsproteine [118]. Weiterhin zeigte sich während der heterologen Proteinexpressionen, dass kleinere Fusionsproteine in größeren Mengen als große Fusionsproteine exprimiert wurden. Dieses Ergebnis konnte man auch so erwarten, da in einer definierten Expressionszeit eine größere Menge an kleinen Proteinen translatiert werden. Des Weiteren ist die Wahrscheinlichkeit höher, dass bei der Transkription bzw. Translation von großen Proteinen öfters Fehler auftreten und daher weniger korrektes Protein exprimiert wird als bei kleineren Proteinen.

4.2 Grenzen der Aufreinigung über die Ni-NTA-Agarose-Säule

In der Abb. 6 unter dem Punkt 3.1.3 ist eine unvollständige Bindung des exprimierten Fusionsproteins HHV6 A gL an die Ni-NTA-Agarose-Säule zu sehen, die auch bei anderen Fusionsproteinen beobachtet werden konnte. Der Verlust von exprimiertem Fusionsprotein durch falsche Pufferkonditionen wurde überprüft und ausgeschlossen. Das Herabsetzen der

Imidazolkonzentration im Lysispuffer von 50mM auf 20mM stärkte die Bindung der Fusionsproteine an die Ni-NTA-Agarose-Säule, führte jedoch gleichzeitig auch zur verstärkten Bindung von unerwünschten bakteriellen Proteinen an die Ni-NTA-Agarose-Säule. Eine weitere mögliche Ursache für die unzureichende Bindung der Fusionsproteine an die Ni-NTA-Säule ist die unvollständige Lyse der Einschlusskörperchen, in denen die Fusionsproteine nach einer Überexpression akkumuliert vorliegen. Die His-Tags sind daher vermutlich nicht frei zugänglich und können mit den Ni-Ionen der Ni-NTA-Säule nicht interagieren. Da zur Herstellung der Mikroblobs pro Antigen nur 7µg Fusionsprotein notwendig waren und die eluierten Fusionsproteine durch eine weitere Elektrophorese von den verunreinigten Proteinen getrennt sowie nach dem Blotten aus der Blotmembran ausgeschnitten wurden, waren die exprimierten Proteinmengen sowie die Reinheit der eluierten Fusionsproteine zwischen 50 und 90% als ausreichend für weitere Tests anzusehen.

4.3 Semiquantitative Auswertung der Mikroblobdaten

Zwanzig Prozent der HCMV-IgG- und HHV6-IgG-Mikroblobs konnten nicht ausgewertet werden, da die von der Attomol GmbH zur Verfügung gestellte Software die Markerbanden, welche eine erfolgreiche Immunfärbung signalisieren, auf Grund der starken Hintergrundfärbung nicht erkannte. Das Erkennen der Markerbande durch die Software ist für die Auswertung der Mikroblobs jedoch Voraussetzung. Bei weiteren ca. 25% der Antigen-Antikörperreaktionen ermittelte die Software auf Grund von unspezifischer Hintergrundfärbung und der Formenvarianz der Antigenbanden falsche digitale Werte. Während des Westernblots transferieren und binden Antigene an die Nitrozellulosemembran proteinspezifisch beispielsweise auf Grund ihrer Molekulargewichte und der Porengröße der Nitrozellulosemembran unterschiedlich gut [119]. Die Querschnitte der Antigenbanden können sich daher von Bande zu Bande unterscheiden. Auf Grund der Formenvarianz außerhalb der Bandenmessfelder liegende Antigenbanden führen zu falschen Messergebnissen. Die Hauptursache für die unspezifischen Hintergrundfärbungen sind die durch hydrophobische oder elektrostatische sowie ionische Kräfte verursachten unspezifischen Bindungen der Primärantikörper der humanen Seren oder der Konjugat-Antikörper an die Nitrozellulosemembran [120]. Außerdem können durch das Auftauen der Serum- bzw. Plasmaproben Ig-haltige Molekülaggregate entstehen, die verstärkt unspezifische Hintergrundfärbungen verursachen. Eine andere mögliche Ursache für unspezifische Hintergrundfärbungen könnte die Aggregation des Chromogens oder Konjugats, verursacht beispielsweise durch falsche Lagerung des Konjugat- oder Substratpuffers sein [120]. Eine falsche Zusammensetzung des Puffers kann ebenfalls zu einer unvollständigen Lösung des Chromogens führen. Die einfachste Methode zur

Reduzierung unspezifischer Hintergrundfärbungen ist das Blockieren unspezifischer Bindestellen mit anderen Serumproteinen, wie z.B. Rinderserumalbumin, fetalem Kälberserum oder Casein. Dem Probenpuffer, der zur Verdünnung der humanen Seren diente, wurden durch die Firma Attomol definierte Substanzen zugesetzt, die die unspezifischen Bindungen der Primärantikörper der humanen Seren an die Nitrozellulosemembran minimieren sollten. Durch den Zusatz von Detergenzien oder durch pH-Wertanhebung der Probenpuffer können hydrophobe Bindungen der Antikörper ebenfalls reduziert werden [120]. Eine weitere Möglichkeit neben dem Blocken der unspezifischen Bindestellen und dem Zusatz von Detergenzien in den Probenpuffer ist die Reduktion der primären Antikörperkonzentration. Um die gefärbten Antigenbanden in den Mikroblots trotz unspezifischer Hintergrundfärbungen und variierender Positionierung der Antigenbanden zu beurteilen, wurde eine semiquantitative Auswertung durchgeführt. Die Beurteilung der Bandenfärbung erfolgte visuell. Die Antigenbanden wurden auf Basis des Färbungsgrades mit einer Abstufung von 1 bis 4 beurteilt. Da bekannt ist, dass visuelle Beurteilungen sich zwischen verschiedenen Beobachtern unterscheiden [121], erfolgte die Auswertung der gefärbten Antigenbanden immer durch ein und dieselbe Person.

4.4 Optimierung der Farbreaktion im Mikroblot

Die ersten gefärbten Mikroblots wiesen starke Hintergrundfärbungen auf. Außerdem wirkten die gefärbten Antigenbanden schwach und verschwommen. Die Verwendung eines Rotationsschüttlers während der Inkubationszeiten und der Waschzeiten führte zur Reduktion der Hintergrundfärbung. Die Färbung der Banden hingegen wurde kräftiger und war weniger diffus. Methodisch bedingt muss sich der Mikroblot nahe dem Plattenboden befinden. Der enge Spalt zwischen dem Mikroblot und dem Plattenboden führt dazu, dass Diffusionsvorgänge im Mikroblot nicht mit der gleichen Kinetik wie in der Mikrotiterplatte ablaufen. Dieses Problem wurde durch die Verwendung eines Rotationsschüttlers während der Inkubation und der Waschschriffe gelöst. Die Rotationsbewegung des Schüttlers unterstützt die Diffusionsvorgänge zwischen dem Mikrotiterplattenboden und dem Mikroblot. Nicht gebundene oder unspezifische Antikörper der Serum- bzw. Konjugatflüssigkeit werden durch die zirkulierende Waschflüssigkeit effektiver gewaschen, wodurch die Hintergrundfärbung reduziert wird. Weiterhin können die Antikörper der Seren besser in die Nähe der Antigene gelangen und an diese binden.

4.5 Seren, Plasmen und Liquores - im Mikroblobt einsetzbare Probenmaterialien

4.5.1 Vergleich der Reaktivität von Seren und Plasmen im Mikroblobt

Das von einem Patienten stammende und am gleichen Tag gewonnene Serum-/ Plasmapaar erzeugte im HCMV-IgG- bzw. HHV6-IgG-Mikroblobt für das Auge sichtbar vergleichbare Farbmuster der Antigenbanden. Die Ergebnisse der multivariaten Varianzanalyse mit Messwiederholung zeigen, dass die Gruppenmittelwerte der mit dem HCMV-IgG-Mikroblobt und dem HHV6-IgG-Mikroblobt ermittelten Antigensummen der Seren und Plasmen nicht signifikant unterschiedlich sind ($p=0,072$ für den HCMV-IgG-Mikroblobt, $p=0,057$ für den HHV6-IgG-Mikroblobt bei $\alpha=0,05$). In den Plotdiagrammen 5 und 6 unter Punkt 3.2.3.1 wird jedoch deutlich, dass die Antigenbanden bei der Reaktion mit Seren im Vergleich zu Plasmen im Durchschnitt sowohl im HCMV-IgG-Mikroblobt als auch im HHV6-IgG-Mikroblobt stärker gefärbt sind. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass im Plasma Substanzen zu finden sind, die die Antigen-Antikörper-Reaktion stören. Als Plasma wird der nicht zelluläre Bestandteil des Blutes, der im Gegensatz zum Blutserum bzw. Serum noch alle Gerinnungsfaktoren, wie Fibrin oder Fibrinogen enthält, bezeichnet. Möglicherweise interagiert das Fibrinogen bzw. Fibrin mit den Antikörpern im Plasma und erschwert so die Bindung der Antikörper an die Antigene im Mikroblobt, was durch eine minimal schwächere Bandenfärbung deutlich wird. Allner (1985) konnte zeigen, dass Fibrinogen störend in verschiedenartigen Enzymimmunoassays interferiert [122]. Die Auswirkung der Effekte auf das Ergebnis wurde abhängig vom Testprinzip (Sandwich-Technik oder Bindungsassay) als variabel beschrieben. Tate et al. (2004) verwiesen dagegen darauf, dass die Maskierung der Antikörper durch Fibrin im Plasma die Antikörper-Antigenreaktion im Immunoassay beeinflussen kann [123]. Eine andere mögliche Ursache für die nicht signifikante schwächere Bandenfärbung bei der Verwendung von Plasmen im Mikroblobt ist, dass durch die Anwesenheit von ca. 3% mehr Protein (Fibrin und Fibrinogen) im Plasma sowie die räumlich engeren Verhältnisse im Mikroblobt die Bindung der Antikörper an die Antigene erschwert wird. Die statistische Analyse der zehn Plasma/ Serumpaare ergab bei grenzwertiger Signifikanz ($p=0,072$ für den HCMV-Mikroblobt, $p=0,057$ für den HHV6-IgG-Mikroblobt bei $\alpha=0,05$) keinen signifikanten Unterschied. In einer 2. Studie sollte untersucht werden, ob bei einer größeren Anzahl an Serum-/ Plasmapaaren ein signifikanter Unterschied zwischen Seren und Plasmen auftritt. Eine weitere interessante Fragestellung wäre, ob der mit dem Mikroblobt messbare Reaktivitätsunterschied zwischen Serum und Plasma auch mit der ELISA-Technologie nachweisbar ist.

4.5.2 Liquordiagnostik – Möglichkeiten und Grenzen mit dem Mikroblob

Erste Versuche mit Liquores zeigten, dass Liquordiagnostik mit dem HCMV-IgG-Mikroblob möglich ist. Vier Liquores der drei HCMV-positiven Patienten (von insgesamt fünf Patienten) wiesen Reaktivitäten mit den Antigenen im HCMV-Mikroblob auf. Der IgG-Index nach Reiber ($Q_{IgG} = \frac{IgG \text{ Liquor}}{IgG \text{ Serum}}$, $Q_{alb} = \frac{alb \text{ Liquor}}{alb \text{ Serum}}$) zur Bestimmung von intrathekalen IgG-Antikörperproduktion z.B. auf Grund entzündlicher Erkrankungen des Nervensystems wurde nicht ermittelt, da die Versuche erste Hinweise für die Möglichkeit der HCMV-Liquordiagnostik liefern sollten. Für die Vorversuche wurde ein durchschnittlicher $Q(IgG) = 5 \times 10^{-3}$ angenommen. Dementsprechend wurden bei einer Liquorverdünnung von 1:2 die parallelen Serumproben 1:400 vorverdünnt. Im Gegensatz zu HCMV-Liquordiagnostik ist die HHV6-Liquordiagnostik in den Laboratorien keine Routinediagnostik. In der Literatur gibt es nur wenige Artikel [124, 125] über den serologischen Nachweis von HHV6 spezifischen Antikörpern im Liquor. Derfuss et al. (2005) konnten mit der ELISA-Methode bei 34% der Patienten mit einer Multiplen Sklerose und bei 12% der Kontrollpatienten mit anderen neurologischen Erkrankungen im Liquor HHV6-spezifische Antikörper nachweisen [124]. Die acht im HHV6-IgG-Mikroblob mit einer Verdünnung von 1:2 getesteten Liquores zeigten keine Reaktion mit den HHV6-Antigenen. Um die für die HHV6-Liquordiagnostik notwendigen antigenen Eigenschaften der HHV6-Antigene zu prüfen, muss in einer folgenden Studie eine größere Anzahl an Patientenliquores im HHV6-IgG-Mikroblob getestet werden. Es ist nicht auszuschließen, dass bei einer intrathekalen HHV6-IgG-Antikörperproduktion HHV6-IgG-Antikörper mit der Mikroblobmethode nachgewiesen werden könnten. Eine mögliche Ursache für den erschwerten Nachweis von HHV6 IgG Antikörpern mit dem HHV6-IgG-Mikroblob in den Patientenliquores ist ein schwacher HHV6-IgG-Antikörpertiter der Patientenliquores. Außerdem wird beim Vergleich der mit dem HHV6-IgG-Mikroblob und dem HCMV-IgG-Mikroblob ermittelten Antigensummen (Mittelwert der Antigensummen im HHV6-Mikroblob = 21; Mittelwert der Antigensummen im HCM-Mikroblob = 27) der Seren von 29 Thrombozyten- und Eigenblutspendern zwischen 18 und 63 Jahren sichtbar, dass die Patientenserum trotz höherer Verdünnung stärker mit den HCMV-Antigenen als mit den HHV6-Antigenen reagierten. Im hiesigen Institut für Virologie am Universitätsklinikum Dresden erfolgt der serologische Routinenachweis von HHV6-Antikörpern mit einem Anti-HHV6-IgG Immunfluoreszenztest der Firma Euroimmun (Lübeck). In der Routinediagnostik werden HHV6-IgG-Titer von 1:20 bis 1:80 gemessen. Mit dem vor 20 Jahren eingesetzten vergleichbaren Anti-HCMV-IgG Immunfluoreszenztest für den Nachweis von HCMV-Antikörpern konnte ein bis zu 10-fach höherer Titer (1:640) ermittelt werden. Auch in der Literatur beschriebene geometrische Titer weisen auf im Durchschnitt höhere Konzentrationen von HCMV-IgG-Antikörpern im Vergleich zu HHV6-IgG-Antikörpern in Seren bei vorausgesetzter HCMV- bzw. HHV6-Infektion hin [126-128]. Unterschiedliche

IFT-Methoden auf Grund unterschiedlich verwendeter Zelllinien und Virusstämme bzw. Antigene können ebenfalls unterschiedliche Titeraussagen verursachen. Weiterhin kann möglicherweise das Ergebnis durch den Gesundheitszustand und das Alter der Patienten beeinflusst werden.

4.6 Untersuchungen zur Stabilität der Mikroblobs

Die Stabilität der Mikroblobs wurde an einem Tag und über mehrere Wochen durch die dreifache Bestimmung von 10 Patientenseren in einem Reaktionsansatz und von 10 bzw. 17 Patientenseren an zwei verschiedenen Tagen überprüft.

4.6.1 Reproduzierbarkeit der Messergebnisse in einem Reaktionsansatz

In der ersten Analyse wurde die Reproduzierbarkeit der Färbungsgrade der Antigen-Antikörperreaktionen untersucht. 88% aller Antigene im HCMV-IgG-Mikroblot und 84% aller Antigene im HHV6-IgG-Mikroblot wiesen bei dreifacher Bestimmung in einem Reaktionsansatz den gleichen Färbungsgrad auf. Bei einer auf die „reaktiven Antigene“ beschränkten Analyse zeigten nur 54% im HCMV-IgG-Mikroblot und 50% im HHV6-Mikroblot den gleichen Färbungsgrad. Mögliche Ursachen für die nur moderate Reproduzierbarkeit der Färbungsgrade der einzelnen reaktiven Antigene sind in der Verteilung der Epitope sowie der Antikörperbindung zu suchen. Während der Gelelektrophorese transferieren Antigene auf die Nitrozellulosemembran proteinspezifisch beispielsweise auf Grund ihres Molekulargewichtes unterschiedlich stark [119]. Bolt et al. (1997) beschrieben, dass Proteine mit einem großen Molekulargewicht während der Elektrophorese schlechter auf Membranen transferiert werden [119]. Dagegen sind Nitrozellulosemembranen mit kleinen Poren notwendig, um Proteine mit einem kleinem Molekulargewicht zu halten und zu binden [129]. Es ist daher wahrscheinlich, dass die Querschnitte der Antigenbanden im Mikroblot von Bande zu Bande unterschiedlich groß sind und unterschiedlich viele Epitope in unterschiedlich sterischen Verhältnissen präsentiert werden. Auch Underwood (1993) zeigte, dass die Antigendichte in den festen Phasen der Bindungsassays durch die Bindung an die Plastik variieren [130]. Dass die Anordnung der Epitope einen Einfluss auf die Antikörperbindung hat, beschrieb Mattes (1997) [131]. Polyvalente Seren enthalten eine Vielzahl an verschiedenen IgG Antikörpern, die bivalent sind. Bivalente Antikörper können mit einer hohen Affinität an ein Antigen sowohl bivalent als auch mit einer niedrigeren Affinität monovalent binden. Sie binden komplexe Antigene abhängig von der Antigendichte meist in einer Mischung von bivalenten und monovalenten Bindungen [132], die von Reaktion zu Reaktion variieren kann und daher zu geringfügig unterschiedlichen Färbungen im Mikroblot führen kann. Wie Kaufman und Jain (1992) für den ELISA zeigten [133], ist die bivalente

Gleichgewichts- und Bindungskonstante nur bei identischen experimentellen Konditionen verwendbar. Eine weitere mögliche Ursache für die nur moderate Reproduzierbarkeit der Färbungsgrade ist, dass die bivalente Gleichgewichts- und Bindungskonstante für den Mikroblot vermutlich nicht konstant ist.

Die univariate Varianzanalyse mit Messwiederholung ergab, dass die Streuung der Färbungsgrade der Antigen-Antikörper-Reaktion nicht so stark ist, um signifikante Unterschiede zwischen den im HCMV-IgG- und HHV6-IgG-Mikroblot ermittelten Antigensummen nachzuweisen.

Bei dreifacher Bestimmung der Seren mit dem HCMV-IgG- und HHV6-IgG-Mikroblot konnte für 90% und 80% der Seren der gleiche serologische Status ermittelt werden. Seren, die in der Wiederholung serologisch unterschiedliche Ergebnisse aufwiesen, waren meist grenzwertig oder schwach positiv. Sie wiesen zunächst meist grenzwertige oder schwach positive Reaktivitäten auf und zeigten bei einer wiederholten Messung gar keine oder nur noch grenzwertige Reaktivitäten. Eine Möglichkeit, um Einfluss auf die Spezifität der Mikroblotmethode zu nehmen und mögliche durch kreuzreaktive Antikörper falsch-positive Ergebnisse zu unterbinden, ist die Veränderung der „Cutoff“-Grenze. Es ist bekannt, dass einige Hersteller (Mikrogen, Neuried) von Streifenesttechnologien erst ab zwei schwach reaktiven Antigenen bzw. bei der Reaktivität eines bestimmten Antigens von einem schwach positiven Serum ausgehen. Auch bei der IFT-Methode kann die Cutoff-Grenze von Hersteller zu Hersteller und abhängig vom Beobachter schwanken. Ein folgendes Problem bei Veränderung der Cutoff-Grenze ist, dass die Sensitivität der Mikroblotmethode beeinflusst wird und das falsch-negative Ergebnisse auftreten können. Es muss daher in folgenden Untersuchungen eine Cutoff-Grenze ermittelt werden, die das Gleichgewicht zwischen Sensitivität und Spezifität der Mikroblotmethode optimal widerspiegelt. Dieser Cutoff kann sowohl durch die Anzahl der reaktiven Antigene als auch durch Reaktivität der Antikörper mit einem bestimmten Antigen definiert werden.

4.6.2 Signifikante Unterschiede bei wiederholter Messung an verschiedenen Tagen

Die an zwei verschiedenen Tagen im HCMV-IgG- und HHV6-IgG-Mikroblot ermittelten Antigensummen der Seren waren im t-Test signifikant verschieden. Für 82% der 17 im HCMV-Mikroblot getestete Seren und für 60% der 10 im HHV6-Mikroblot getesteten Seren wurde an beiden Tagen der gleiche serologische Status ermittelt. Diese nicht befriedigende Reproduzierbarkeit der Färbungsgrade und serologischen Ergebnisse ist durch mehrere Faktoren bedingt. Neben den bereits unter Punkt 4.7.1 beschriebenen Ursachen, wie der variierenden Antigendichte, bedingt durch die unterschiedlichen Blotteffizienzen der Proteine sowie der vermutlich nicht konstanten bivalenten Bindungskonstante, können IgG-haltige Molekülaggregate durch wiederholtes Auftauen der Seren zu unterschiedlichen

Färbungsgraden der Antigenbanden führen. Weitere mögliche Ursachen für das Streuen der Färbungsgrade sind unterschiedliche Qualitäten der Blockierungsreagenzien sowie die Aggregation des Chromogens oder Konjugates z.B. als Folge der falschen Lagerung des Konjugat- oder Substratpuffers [120]. Die Aggregation des Chromogens oder Konjugates kann zu einer hohen Farbdichte im Bereich der Banden führen. Um den Mikrobloblot als diagnostisches Testsystem zu nutzen muss die Mikoblotmethode verbessert werden. Die Proteine müssen entsprechend ihrer Bloteffizienzen so geblottet werden, dass sie gleichmäßig auf die Nitrozellulosemembran transferiert werden und eine optimale Präsentation der Epitope gewährleistet werden kann. Die Auswahl der Membranen mit richtigen Porengrößen kann eine optimale Bindung der Proteine unterstützen. Konjugat- und Substratlösung müssen auf die Zusammensetzung und Lagerungsfähigkeit überprüft werden.

4.7 HCMV-Mikrobloblot - ein sensitives diagnostisches Testsystem

Der HCMV-IgG-Mikrobloblot zeigte mit einer Sensitivität von 100% und einer Spezifität von 80% ein gutes Ergebnis, wobei bei einer wiederholten Messung eine Spezifität von 100% gezeigt wurde. Der HCMV IgG-recomBlot wies im Vergleich zum HCMV-IgG-Mikrobloblot mit einer Sensitivität von 100% und einer Spezifität von 93,4% ein besseres Ergebnis auf.

Das Schwanken der Färbungsgrade von schwacher bzw. deutlicher Reaktivität nach negativ bei einigen Antigenbanden in wiederholter Messung war auch bei anderen Seren im gleichen Zeitrahmen zu beobachten. Ursache für die mit dem HCMV-IgG-Mikrobloblot gemessenen Reaktivitäten der sechs HCMV negativen Seren der Antigene HCMV pp150 F1, HCMV pp150 F2, HCMV gB F2, HCMV gB F3, HCMV pp65 F1 und HCMV pp65 F2 im ersten Messdurchgang kann eine falsch eingestellte Konjugatlösung sein. Eine unterschiedliche Qualität der Blockingreagenzien ist eine weitere mögliche Ursache für die gemessenen unterschiedlichen Reaktivitäten. In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Spezifität des HCMV-IgG-Mikrobloblots im Vergleich zum HCMV IgG-recomBlot (Mikrogen) an 21 von Enzygnost* Anti-CMV-IgG-Testserum als grenzwertig eingestuft Seren geprüft. Der klinische Verlauf der Patienten zeigte, dass alle drei HCMV-IgG-Testsysteme nicht in der Lage waren, alle 21 Seren serologisch richtig einzustufen. Miller et al. (1989) beschrieben ebenfalls die unterschiedliche Fähigkeit von serologischen Testsystemen, HCMV-IgG-Antikörper nachzuweisen [134]. Das verdeutlicht, dass die diagnostischen Testsysteme bei sehr niedrigen IgG-Antikörperkonzentrationen und wahrscheinlich starken Assayinterferenzen an ihre Grenzen stoßen. In solchen Situationen kann bei einem klinisch akuten Fall nur auf eine HCMV PCR oder den pp65-Antigenassay zurückgegriffen werden. Bei klinisch nicht akuten Fällen muss eine Verlaufskontrolle Klarheit schaffen. Eine mögliche Fehlerquelle für falsch-positive Ergebnisse im HCMV-IgG-Mikrobloblot ist die Bindung der

polyklonalen Serumantikörper an Fremd-*E. coli*-Proteine. Die in *E. coli* (BL21-Zellen) exprimierten viralen Fusionsantigene wurden über eine Ni-NTA-Agarosesäule aufgereinigt. Anschließend erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese nochmals eine Trennung der viralen Fusionsproteine von den *E. coli*-Proteinen. Da kein Nachweis z.B. mittels HPLC über die Reinheit der Antigenfraktionen geführt wurde, ist eine Kontamination der Antigenfraktion mit Fremdproteinen nicht auszuschließen. Ein weiterer Reinigungsschritt könnte diese falsch-positiven Ergebnisse möglicherweise unterbinden. Kreuzreaktive Autoantikörper sind eine andere mögliche Ursache für unspezifische Reaktionen.

4.8 Drei verschiedene HHV6-Testsysteme – drei verschiedene HHV6-Prävalenzen

In der Literatur wurden immer wieder Patienten beschrieben, die im Speichel oder in den peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) HHV6-DNA aufwiesen, bei denen jedoch im Serum oder Plasma mit den üblichen HHV6-Testsystemen keine HHV6-IgG-Antikörper nachgewiesen werden konnten [23, 135]. Auch in der Routinediagnostik des Institutes für Virologie an der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus der TU Dresden sind falsch-negative Ergebnisse und Kreuzreaktionen des verwendeten Anti-HHV6-IgG-Immunfluoreszenztest (Euroimmun, Lübeck) ein bekanntes Problem. Neben den methodenbedingten Schwankungen bereitet die Tatsache, dass die HHV6-Prävalenz auch geographisch und altersabhängig streuen kann [127, 136, 137], bei der Beurteilung der Qualität von HHV6-Testsystemen Schwierigkeiten. Trotz verschiedener auch kommerziell erhältlicher HHV6-Testsysteme gibt es keinen Goldstandard, der zur Beurteilung der Sensitivität und Spezifität für den HHV6-Mikroblot dienen kann. Die Beurteilung der Sensitivität und Spezifität des HHV6-Mikroblots musste daher durch den Vergleich mit den beiden kommerziell erhältlichen HHV6-Testsystemen HHV6-IgG-IFT (Euroimmun, Lübeck) und HHV6-IgG-ELISA (Panbio, Rüsselsheim) sowie durch den Vergleich mit den in der Literatur beschriebenen HHV6-Prävalenzuntersuchungen erfolgen. Der Vergleich der Ergebnisse der drei HHV6-Testsysteme zeigt, dass drei verschiedene HHV6-Testsysteme für die gleichen Testseren (60 Erwachsenenserum und 29 Kinderseren) drei verschiedene HHV6-Prävalenzen ermitteln, wobei der HHV6-IgG-Mikroblot mit dem HHV6-IgG-IFT mehr übereinstimmende Ergebnisse aufweist als mit dem HHV6-IgG-ELISA. Eine wahrscheinliche Ursache für die unterschiedlich ermittelten HHV6-Prävalenzen ist der Einsatz von verschiedenen HHV6-Antigenen in unterschiedlichen HHV6-Testsystemen. Im HHV6-IgG-IFT liegen laut dem Hersteller Euroimmun (Lübeck) HHV6-A-Antigene, die methodenbedingt Konformationsepitope, aber auch lineare Epitope aufweisen. Im HHV6-IgG-ELISA hingegen liegen nach Aussagen des Herstellers Panbio (Rüsselsheim) HHV6 B-Antigene vor. Für die Herstellung des HHV6-Mikroblots wurden jeweils fünf HHV6 A- und HHV6 B-Antigene verwendet, die nur lineare Epitope aufweisen. Außerdem hat die

Epitopräsentation der Antigene, die durch die Aufreinigungsmethoden und die Darstellung der Antigene im Testsystem bedingt ist, einen Einfluss auf die Ergebnisse der Testsysteme. Beispielsweise können durch die Fixierungsmethoden der lysierten Zellen im HHV6-IgG-IFT Epitope maskiert werden, die dadurch für die IgG-Antikörper nicht erkennbar sind. Die für den Mikroblot exprimierten HHV6-Fusionsantigene wurden durch eine SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend geblottet. Durch die Aufnahme der Fusionsantigene in den SDS-Probenpuffer, der neben dem SDS auch Mercaptoethanol enthält, wurden die Antigene mit einer negativen Ladung maskiert und die Di-Sulfidbrücken der Antigene protoniert. Die HH6-Antigene in den Mikroblots liegen daher in linearisierter Form vor und weisen keine Sekundärstrukturen auf. Nach dem Blotten kann es an den C- und N-terminalen Enden der Antigene zu Rück-Faltungen kommen, die jedoch nicht der natürlichen Sekundärstruktur des Antigens entsprechen. Außerdem sind die HHV6-Befunde durch die Reaktionsumgebung und die Reaktionskomponenten der HHV6-Testmethoden bedingt. Fluoreszenzfärbungen, die z.B. durch Autoantikörper oder Kreuzreaktionen verursacht sind, können zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Unspezifische Hintergrundfärbungen im HHV6-IgG-Mikroblot aber auch im HHV6-IgG-ELISA z.B. durch unspezifische Antikörper oder falsche Lagerung des Konjugat- oder Substratpuffers können ebenfalls zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Da die Cutoff-Grenze der verschiedenen hergestellten HHV6-Testsysteme unterschiedlich definiert ist, kann dies eine weitere mögliche Ursache für unterschiedliche HHV6-Befunde sein. Auch die subjektive Beurteilung der Ergebnisse beim HHV6-IgG-Immunfluoreszenztest bzw. HHV6-IgG-Mikroblot durch den Analytisten kann eine weitere Ursache für unterschiedliche HHV6-Befunde sein.

Die mit dem HHV6-IgG-Mikroblot und dem HHV6-IgG-IFT ermittelten positiven HHV6-Prävalenzen von 90% und 98,4% der Erwachsenenseren sind mit den in der Literatur beschriebenen HHV6-Durchseuchungen der Bevölkerung von 80% [16] bis 95% vergleichbar [35, 135, 138]. Der HHV6-IgG-ELISA konnte nur 66,7% positive HHV6-Seren finden. Es ist daher wahrscheinlich, dass der HHV6-IgG-ELISA nicht sensitiv genug ist und falsch-negative Ergebnisse aufweist. Auch bei den getesteten 29 Kinderseren wies der HHV6-IgG-ELISA mit 22,2% für die Kinder unter 2 Jahren (9 Seren) und mit 55% für die Kinder über 2 Jahren (20 Seren) im Vergleich zum HHV6-IgG-IFT und HHV6-IgG-Mikroblot die geringste positive HHV6-Prävalenz auf. Der HHV6-IgG-Mikroblot und der HHV6-IgG-IFT beurteilten 70% der Kinderseren über 2 Jahren und 44,4% bzw. 33,3% der Kinderseren unter 2 Jahren als positiv. Das durchschnittliche Alter der neun Kinderseren unter 2 Jahren lag bei 1 Jahr. Zerr et al. (2005) zeigten durch den Nachweis von HHV6-DNA im Speichel, dass die Anzahl an mit HHV6 infizierten Kindern nach der Geburt kontinuierlich steigt und ca. 40% der Kinder bis zum 1. Lebensjahr mit HHV6 infiziert sind [139]. Dieser Befund korreliert mit den Ergebnissen des HHV6-IgG-Mikroblot (44,4%) und HHV6-IgG-IFT (33,3%). Die Zunahme an infizierten HHV6-Kindern wird durch den Anstieg der spezifischen HHV6-IgG-Antikörper

zwischen dem 9. und 12. Lebensmonat sichtbar [16, 17]. Andere Prävalenzstudien aus Italien, Thailand, Argentinien und Deutschland zeigen für Kinder um 1 Jahr HHV6-Seroprävalenzen von 60,61% bis 92,68% [35], [140-143] und liegen damit über den von Zerr et al. (2005) beschriebenen 40% an infizierten Kindern um 1 Jahr [139] sowie über den ermittelten HHV6-Prävalenzen des HHV6-IgG-Mikroblots, des HHV6-IgG-IFTs und des HHV6-IgG-ELISA. Die verschiedenen HHV6-Prävalenzen können durch unterschiedlich definierte Cutoffs der HHV6-Testsysteme oder die Verwendung unterschiedlicher Antigene im Testsystem sowie geographisch unterschiedliche HHV6-Antikörpertiter verursacht sein. Wie bereits beschrieben, können die Antikörpertiter in verschiedenen Bevölkerungen variieren. Bis zum 2. Lebensjahr steigt die Infektionsrate stetig an und die HHV6-Prävalenz der Kinder ist mit der Prävalenz der Erwachsenen vergleichbar. Das durchschnittliche Alter der getesteten 20 Kinder über 2 Jahre lag mit 9,9 Jahren deutlich über 2 Jahren. In diesem Alter entspricht die HHV6-Seroprävalenz der HHV6-Prävalenz der Erwachsenen und bleibt stabil [35] bzw. fällt leicht ab [141, 143]. Die mit dem HHV6-IgG-Mikroblot, dem HHV6-IgG-IFT und dem HHV6-IgG-ELISA ermittelten HHV6-Prävalenzen von 55% bis 70% liegen unter den in der Literatur beschriebenen HHV6-Prävalenzen der Erwachsenen von 80% bis 95%. Auch bei diesen unterschiedlich gemessenen HHV6-Prävalenzen können methodische Ursachen, wie die Verwendung unterschiedlicher Antigene im Testsystem oder die Definition des Cutoffs sowie geographische Ursachen eine Rolle spielen. Eine Beurteilung der Sensitivität und Spezifität des HHV6-Mikroblots ist schwierig, da der Vergleich der Ergebnisse der drei HHV6-Testsysteme mit den in der Literatur beschriebenen HHV6-Prävalenzen auf Unterschiede im Testsystem, aber auch mögliche geographische Unterschiede der HHV6-Prävalenzen hinweist. Die Ergebnisse zeigen auch, dass der HHV6-IgG-Mikroblot und der HHV6-IgG-IFT sensitiver als der HHV6-IgG-ELISA sind, wobei der HHV6-IgG-Mikroblot und der HHV6-IgG-IFT eine vergleichbare Sensitivität aufweisen. Alle drei HHV6-Testsysteme wiesen einen kontinuierlichen Anstieg der HHV6-Antikörper nach der Geburt auf. Zusätzlich konnte mit dem HHV6-IgG-Mikroblot die negative Korrelation zwischen zunehmendem Alter und abnehmendem HHV6-IgG-Antikörpertiter der Patienten, die Yanagi et al. (1990) zeigte [144], bestätigt werden. Dies verweist darauf, dass der HHV6-IgG-Mikroblot als auch der HHV6-IgG-IFT und der HHV6-IgG-ELISA fähig sind, HHV6-Antikörper spezifisch nachzuweisen.

4.9 Der Mikroblot – eine serologische Methode zur Unterscheidung von monovalenten HHV6 A- und HHV6 B-Seren

In der Literatur sind viele verschiedene Methoden zur Unterscheidung von HHV6 A- und HHV6 B-Infektionen bzw. –Reaktivierungen, wie z.B. die Varianten-spezifische HHV6 PCR [145], die Varianten-spezifische nested PCR [146], die Varianten-spezifische Real Time-PCR

[147] oder die Varianten-spezifische DNA PCR Oligohybridisierungsmethode [26] und der Varianten-spezifische Restriktionsverdau [148] beschrieben. Jedoch gibt es keine kommerziellen HHV6-Testsysteme, die serologisch zwischen HHV6 A- und HHV6 B-Infektionen bzw. -Reaktivierungen unterscheiden. Ein wichtiges Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Entwicklung eines serologischen HHV6-Testsystems zur Unterscheidung von HHV6 A- und B-Infektionen bzw. -Reaktivierungen. Dazu wurden jeweils fünf HHV6 A- und HHV6 B-Antigene rekombinant hergestellt und über die Ni-NTA-Agarosesäule aufgereinigt. Vier der fünf HHV6 A-Antigene weisen homologe Proteinsequenzen zu vier der fünf HHV6 B-Antigene auf, wobei die homologen Antigene Sequenzunterschiede von 10% bis 24% zeigen.

4.9.1 Serologische Dominanz des HHV6 B-Subtyps

Bei der serologischen Beurteilung der 90 Testseren (60 Erwachsenenserum und 30 Kinderseren) zeigte sich, dass über 80% der Erwachsenen IgG-Antikörper sowohl gegen HHV6 A-Antigene, als auch gegen HHV6 B-Antigene aufwiesen und daher vermutlich mit HHV6 A und HHV6 B infiziert sind. Da die polyvalenten Seren der Erwachsenen häufiger und stärker mit den HHV6 B-Antigenen als mit den HHV6 A-Antigenen reagierten, ist eine häufigere Re-Infektion bzw. Reaktivierung mit HHV6 B anzunehmen. Insgesamt 11,7% der Erwachsenenserum waren HHV6 B-monovalent und daher vermutlich nur mit HHV6 B infiziert. Dagegen reagierte nur eines der 60 Erwachsenenserum (1,7%) nur mit drei HHV6 A-Antigenen. Die Dominanz des HHV6 B-Subtypen gegenüber dem HHV6 A-Subtypen in Europa und in den USA ist in der Literatur bereits beschrieben wurden [23, 145]. Aberle et al. (1996) konnten mit einer Subtyp-spezifischen nested PCR zeigen, dass 98% der Erwachsenen mit HHV6 B und 16% zusätzlich mit HHV6 A infiziert sind, wobei HHV6 A-DNA nur in den mononukleären peripheren Blutzellen nachgewiesen wurde [23]. Im Speichel hingegen wurde nur HHV6 B-DNA nachgewiesen. Dass über 50% der Erwachsenen mit beiden HHV6-Subtypen infiziert sind, konnte ebenfalls durch die Untersuchungen an Lungengewebe mittels einer Subtyp-spezifischen PCR von Cone et al. (1996) gezeigt werden [149]. Für 64,7% der Patienten konnten im Lungengewebe beide HHV6-Subtypen nachgewiesen werden. Nur zwei der Lungengewebe (5,9%) waren ausschließlich mit HHV6 A und sieben nur mit HHV6 B (29,4%) infiziert. Das von Cone et al. (1996) gezeigte Verhältnis der HHV6 Infektionen von 64,7% Mischinfektionen, 29,4% HHV6 B-Infektionen und 5,9% HHV6 A-Infektionen [142] konnte mit dem HHV6-IgG-Mikroblot von 81,7% Mischinfektionen, 11,7% HHV6 B-Infektionen und 1,7% HHV6 A-Infektionen serologisch bestätigt werden. Drei (5%) der 60 Erwachsenenserum wiesen keine mit dem HHV6-IgG-Mikroblot nachweisbaren spezifischen HHV6 Antigen-spezifischen IgG-Antikörper auf. Da der HHV6-IgG-IFT und der HHV6-IgG-ELISA zwei der drei Seren als HHV6-positiv beurteilten, ist mangelnde Sensitivität

des HHV6-IgG-Mikroblots gegenüber diesen Seren eine mögliche Ursache für die negative Beurteilung der Seren.

Eine deutliche Dominanz des HHV6 B-Subtypen konnte serologisch auch bei Kindern unter 2 Jahren beobachtet werden. 40% (4 Seren) der Seren von Kindern unter 2 Jahren (10 Kinderseren insgesamt mit einem Durchschnittsalter von 1 Jahr) wurden mit dem HHV6-Mikroblot als HHV6 positiv eingestuft. Drei der vier Kinderseren waren HHV6 B-monovalent. Nur ein Kinderserum wies sowohl IgG-Antikörper gegen HHV6 A-Antigene als auch gegen HHV6 B-Antigene auf. Ward et al. (2007) wiesen für Europa in 99% den HHV6 B-Subtypen als Ursache für die HHV6-Primärinfektion nach [150]. Auch Dewhurst et al. (1993) zeigten, dass in den USA 97% der symptomatischen HHV6-Primärinfektionen durch HHV6 B verursacht werden [20]. In Südafrika hingegen konnte der HHV6 A-Subtyp als Hauptverursacher für die HHV6-Primärinfektion ermittelt werden [151]. Re-Infektionen mit HHV6 A konnten Caserta et al. (2004) bei einem 5,5 Jahre alten und bei einem 7,4 Jahre alten Kind beobachten [146]. Mit dem HHV6-IgG-Mikroblot konnte serologisch ebenfalls eine Zunahme der HHV6 A Antigen-spezifischen IgG-Antikörper bei Kindern über 2 Jahren beobachtet werden. Insgesamt 76,5% der Seren von Kindern mit einem durchschnittlichen Alter von 9,9 Jahren waren HHV6 polyvalent und wiesen HHV6 IgG-Antikörper gegen die HHV6 A- und B-Antigene auf. Dagegen waren 23,5% der Kinderseren HHV6 B-monovalent. HHV6 A-monovalente Kinderseren wurden in beiden Kindergruppen nicht gefunden. Die mit dem HHV6-IgG-Mikroblot ermittelten Ergebnisse zeigen, dass Kinder zuerst mit HHV6 B infiziert werden, was wahrscheinlich über den Speichelkontakt der Eltern erfolgt. Erst in einem späteren Alter erfolgt dann die Re-Infektion mit HHV6 A. Ausnahmen stellen Kinder mit integrierter HHV6-DNA dar. Ward et al. (2007) konnten bei vier Patienten mit integrierter HHV6-DNA im Alter von 0 Monaten, 4 Monaten, 2,8 Jahren und 12 Jahren den HHV6 A-Subtypen im Serum nachweisen [150].

4.9.2 Interpretation der IgG-Antikörperreaktionen mit den homologen HHV6-Antigenpaaren

Dass einige IgG-Antikörper Subtyp-spezifisch nur mit einem Antigen der homologen Antigenpaare reagierten, während andere IgG-Antikörper kreuzreaktiv mit beiden Antigenen der homologen Antigenpaare reagierten, legt die Vermutung nahe, dass die homologen HHV6 A- und HHV6 B-Antigene sowohl Subtyp-spezifische Epitope tragen, als auch Epitope aufweisen, die kreuzreaktiv sind. Der Vergleich der IgG-Antikörpermuster der homologen Antigenpaare HHV6 A/ B pp100 F1 und HHV6 A/ B pp100 F2 verdeutlicht, dass die Antigene des homologen Antigenpaares HHV6 A/ B pp100 F2 mit 8,9% mehr Testseren häufiger als die Antigene des homologen Antigenpaares HHV6 A/ B pp100 F1 kreuzreaktiv waren. Dieses Ergebnis lässt mehr kreuzreaktive Epitope im C-terminalen Bereich (Fragment 2) als

im N-terminalen Bereich des Tegumentprotein pp100 vermuten. Diese Vermutung wird durch das Wissen, dass im C-terminalen Bereich (Fragment 2) im Unterschied zum N-terminalen Bereich (Fragment 1) des Tegumentproteins pp100 5% mehr homologe Sequenzen vorliegen, gestützt.

Die differenzierte Auswertung der HHV6 IgG-Antikörperverläufen nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSZT) zeigte, dass bei HHV6 B pp100 F1 Antigen-spezifischen IgG-Antikörperreaktionen in 6 von 7 Fällen (86%) auch HHV6 A pp100 F2 Antigen-spezifische IgG-Antikörperreaktionen zu beobachten waren. Der Vergleich der Proteinsequenzen der homologen Antigenpaare verweist darauf, dass die Antigene HHV6 B pp100 F1 und HHV6 A pp100 F2 im Proteinbereich aa 569 bis 614 einen überlappenden Bereich aufweisen (Abb. 22). Dieser überlappende Proteinbereich ist 57 Aminosäuren groß und trägt wahrscheinlich ein Epitop, welches kreuzreaktiv ist und daher nicht zwischen den HHV6-Subtypen unterscheidet. Um den genauen Sequenzbereich des vermuteten Epitops zu bestimmen, ist die Epitopkartierung mit monoklonalen Antikörpern eine mögliche Methode.

Die Antigen-spezifischen IgG-Antikörpermuster der homologen HHV6 A/ B pp100 F1- und HHV6 A/ B pp100 F2-Antigenpaare legen die Wahrscheinlichkeit nah, dass im N-terminalen und im C-terminalen Bereich des Tegumentproteins pp100 Subtyp-spezifische Epitope liegen. Das Antigen-spezifische IgG-Antikörpermuster des HHV6 A/ B pp100 F1-Antigenpaares zeigte, dass 35,5% der Testseren allein mit dem HHV6 B pp100 F1-Antigen reagierten, wohingegen 1,1% der Testseren allein mit dem HHV6 A pp100 F1-Antigen reagierten. Weiterhin war im Antigen-spezifische IgG-Antikörpermuster des HHV6 A/ B pp100 F2-Antigenpaares zu sehen, dass 10% der Testseren Subtyp-spezifisch allein mit dem HHV6 A pp100 F2 Antigen reagierten, wohingegen kein Testserum allein mit dem HHV6 B pp100 F2 Antigen reagierte. Eine serologische Unterscheidung der HHV6-Subtypen allein durch ein homologes Antigenpaar ist jedoch nicht möglich ist.

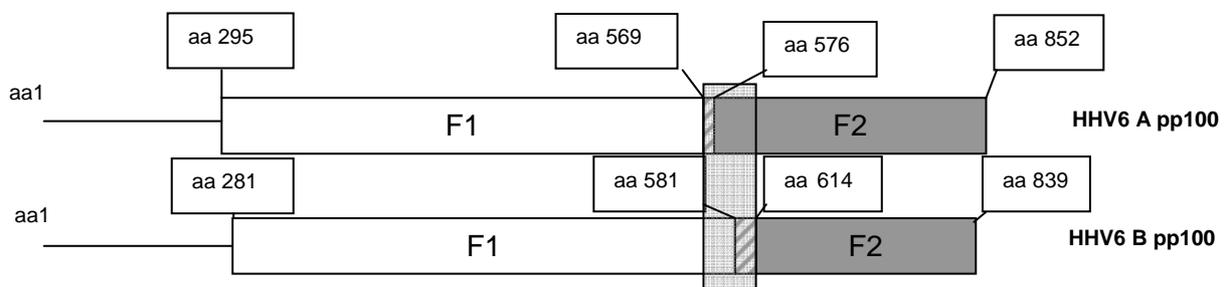


Abb. 22: schematische Darstellung der Überlappungsbereiche der HHV6 A pp100 F1/ F2- und HHV6 B pp100 F1/ F2-Antigene

4.10 Unterschiedliche HCMV- bzw. HHV6-IgG-Antikörperkinetiken nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSZT)

HHV6-Reaktivierungen treten durchschnittlich 14-28 Tage nach der Blutstammzelltransplantation [46, 47, 93] und damit früher als HCMV-Reaktivierungen auf, die durchschnittlich 33-135 Tage nach der Blutstammzelltransplantation zu beobachten sind [94-97]. Die qualitative oder quantitative PCR ist in vielen diagnostischen Routinelaboren und Forschungseinrichtungen die Methode der Wahl, um HHV6- oder HCMV-Reaktivierungen sowie -Infektionen nach der hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSZT) nachzuweisen. Mit der qualitativen nested PCR und einer sich anschließenden quantitativen Real-Time-PCR (RT-PCR) wurde in der Routinediagnostik des Institutes für Virologie an der Medizinischen Fakultät der TU Dresden für sechs der 17 Patienten (35,3%) 15 bis 54 Tage nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation im Blutplasma HHV6-DNA als Indiz für eine HHV6-Reaktivierung nachgewiesen. Andere Autoren, wie beispielsweise Dzieciatkowski (2008), konnten mit 30% [152], 42,5% [153], 48% [93], 48,6% [154] für vergleichbar viele Patienten HHV6-Reaktivierungen nach der HSZT nachweisen. Die schwach unterschiedlichen Prozentzahlen der nachgewiesenen HHV6-Reaktivierungen sind vermutlich durch die unterschiedlichen Nachweismethoden, die malignen Grunderkrankungen und die Therapien der Patienten verursacht [87]. Die Graft Versus-Erkrankung (GvHD) kann ebenfalls einen Einfluss auf die HHV6-Reaktivierung nehmen [87]. Weiterhin wurde in der Routinediagnostik des Institutes für Virologie an der Medizinischen Fakultät der TU Dresden für neun von zehn HCMV-positive Patienten (90%), deren Transplantationsspender HCMV-negativ waren, im Blutplasma HCMV-DNA als Indiz für eine HCMV-Reaktivierung zwischen 34 und 405 Tagen nach der HSZT nachgewiesen. Aber nur bei 50% der HCMV-positiven Patienten (sechs von zwölf Patienten) mit HCMV-positiven Transplantat Spendern wurden zwischen 11 und 145 Tagen nach der HSZT HCMV-DNA im Blutplasma nachgewiesen. Diese Ergebnisse decken sich mit den von Matthes-Martin et al. (2003) beschriebenen Beobachtungen, dass HCMV-Reaktivierungen bei einem HCMV-positiven Empfänger durch die Auswahl eines HCMV-positiven Spenders reduziert werden können [92]. Der HCMV-Serostatus der Empfänger und Spender ist dabei ein entscheidender Risikofaktor für eine HCMV-Infektion bzw. -Reaktivierung [155].

Serologische Testmethoden werden im Vergleich zum pp65-Antigentest und zu molekularbiologischen Methoden wie z.B. der PCR als Nachweismethode für HHV6-Reaktivierungen oder HCMV-Reaktivierungen nach einer HSZT selten eingesetzt, da eine frühzeitige Erkennung einer HHV6- oder HCMV-Reaktivierung durch den IgG-Antikörperanstieg bei immunsupprimierten Patienten schwierig ist. Die Störung der humoralen Immunantwort und damit assoziiert die Störung der IgG-Antikörperentwicklung bedingt durch die Chemotherapie, maligne Grunderkrankung, GvHD und

medikamentenbedingte Immunsuppression erschweren den Nachweis einer HHV6- oder HCMV-Reaktivierung durch den IgG-Antikörperanstieg. Aber auch Kreuzreaktionen und fehlende Sensitivität der HHV6-Testsysteme sind weitere mögliche Ursachen für eine schwierige serologische HHV6- bzw. HCMV-Diagnostik nach HSZT. Jedoch konnten Lausen et al. (2004) zeigen, dass übertragene B-Gedächtniszellen im Transplantationspatienten 9 Monate nach der Stammzelltransplantation nach erneutem Kontakt mit dem Antigen (Impfung) IgG-Antikörper produzierende Plasmazellen bilden können [80]. Auch Miyoshi et al. (2001) konnten in Folge einer Virus-Reaktivierung IgG-Antikörperproduktion nach Stammzelltransplantation zeigen [156]. Sie beobachteten, dass 62,5% der untersuchten Transplantationspatienten nach einer allogenen bzw. autologen HSZT einen HHV6-IgG-Antikörperanstieg zeigten, der bei 80% dieser Patienten zeitlich nah zur gezeigten HHV6-Reaktivierung lag. Auch Schoppel et al. (1998) konnten belegen, dass 58,6% Patienten mit einer nachgewiesenen positiven HCMV-PCR nach einer allogenen Knochenmarktransplantation einen Antikörperanstieg aufwiesen [157].

Die mit dem HHV6-IgG- bzw. HCMV-IgG-Mikroblot gemessenen IgG-Antikörperverläufe der Patienten nach HSZT wiesen zwischen nachgewiesener Virus-Reaktivierung und der IgG-Antikörperentwicklung keinen Zusammenhang auf. Nicht nach jeder positiven HCMV- bzw. HHV6-PCR wurde ein IgG-Antikörperanstieg beobachtet, was vermutlich durch die Immunsuppression verursacht ist. Weiterhin konnten HCMV-IgG- bzw. HHV6-IgG-Antikörperanstiege selten zeitnah zur positiven HCMV- bzw. HHV6-PCR-Nachweisen gezeigt werden. Drei von sechs Transplantationspatienten mit positiven HHV6-PCR-Nachweisen wiesen einen HHV6-IgG-Antikörperanstieg auf, wobei nur ein IgG-Antikörperanstieg mit 7 Tagen Verzögerung zeitnah zur positiven HHV6-PCR lag. Dieses Ergebnis unterscheidet sich deutlich zu den Nachweisen von Miyoshi et al. (2001) [156]. Möglicherweise verursachen verschiedene serologische Nachweismethoden diese gemessenen Unterschiede. Aber auch verschiedene Therapien nach der hämatopoetischen Stammzelltransplantation können eine Rolle spielen. Für drei von neun HCMV-positive Patienten (33,3%) mit HCMV-negativen Transplantatspendern und gezeigter positiver HCMV-PCR konnten Antigen-spezifische IgG-Antikörperanstiege nachgewiesen werden. Die beobachteten IgG-Antikörperanstiege wurden 106, 182 und 283 Tage nach der HSZT gemessen und lagen weit von der ersten positiv gemessenen HCMV-PCR entfernt, die 29, 38 sowie 44 Tage nach der HSZT gemessen wurde. Die Antigen-spezifischen IgG-Antikörperverläufe waren von deutlich mehr HCMV-positiven Patienten mit HCMV-positiven Transplantatspendern und positiven PCR-Nachweis durch einen IgG-Antikörperanstieg gekennzeichnet. Vier von sechs HCMV-positive Patienten (66,6%) mit HCMV-positiven Transplantatspendern und mindestens einem positive PCR-Nachweis wiesen einen HCMV Antigen-spezifischen IgG-Antikörperanstieg auf. Zwei der vier Patienten zeigten HCMV IgG-Antikörperanstiege, die mit 35 und 43 Tagen Unterschied zeitnah zur positiven HCMV-PCR

lagen. Die mit dem HCMV-IgG-Mikroblot gemessenen unterschiedlichen IgG-Antikörperkinetiken der HCMV-positiven Patienten mit positiven HCMV-Transplantatspendern oder negativen HCMV-Transplantatspendern korrelierten, wie für HHV6 gezeigt im Unterschied zu Schoppel et al. (1998) [157] nur mäßig mit den HCMV-PCR-Nachweisen. Auch Munoz et al. (2001) fanden keine Korrelation zwischen aktiver HCMV-Infektion und Glykoprotein B-Antikörpertiter [158]. Der von Ludwig et al. (2006) und Ljungman (1986) beschriebene signifikant höhere spezifische IgG-Antikörperlevel bei Patienten mit einer HCMV-Reaktivierung nach einer HSZT konnte mit dem HCMV-IgG-Mikroblot nicht beobachtet werden [159, 160]. Außerdem wiesen sieben Patienten trotz negativer HCMV- bzw. HHV6-PCR 86 bzw. 161 und 36, 57, 79 bzw. 90 Tage nach der HSZT frühe HCMV- bzw. HHV6-IgG-Antikörperanstiege auf. Da die ersten B-Lymphozyten erst drei Monate nach HSZT nachweisbar sind [74, 75] und erst sechs Monate nach der HSZT die ersten B-Lymphozyten den Isotypwechsel vollziehen können [74, 75], sind die gemessenen frühen IgG-Antikörperanstiege bis zu 180 Tagen nach der HSZT bei Patienten mit HCMV-positiven Transplantatspendern durch die Übertragung von B-Gedächtniszellen sowie Plasmazellen verursacht [79, 80]. Chemoradioresistente langlebige Plasmazellen können ebenfalls eine Ursache für die IgG-Antikörperproduktion nach der HSZT auch bei HCMV-positiven Patienten mit HCMV-negativen Transplantatspendern darstellen. Ein Einfluss durch die Immunglobulingaben oder Thrombozytenkonzentrate auf die IgG-Antikörperantwort konnte nicht beobachtet werden, ist aber nicht auszuschließen. Weiterhin wiesen sechs Patienten mit gezeigter positiver HCMV-Reaktivierung eine Abnahme des Antikörperspiegels auf. Auch der von Ludwig et al. (2006) beschriebene langsame aber stetige Anstieg der Glykoprotein B (gB) spezifischen Antikörper bei Patienten ohne HCMV-Reaktivierung konnte mit dem HCMV-Mikroblot nur bei zwei von sieben Patienten beobachtet werden [159].

Einen stetigen Anstieg von HHV6 Antigen-spezifischen IgG-Antikörpern bei Patienten ohne HHV6-Reaktivierung, wie er von Ludwig et al. (2006) gegen gB ohne HCMV-Reaktivierung gezeigt wurde [159], konnte mit dem HHV6-Mikroblot ebenfalls nicht beobachtet werden. Zusammenfassend ist zu sagen, dass mit dem HHV6-IgG bzw. HCMV-IgG-Mikroblot kein Zusammenhang zwischen positiver HHV6- und HCMV-PCR und HHV6- bzw. HCMV-IgG-Antikörperantwort gefunden wurde. Bei nur drei IgG-Antikörperverläufen konnten mit den HHV6-IgG- und HCMV-IgG-Mikroblots IgG-Antikörperanstiege zeitnah zu positiven PCR-Nachweisen beobachtet werden. Der Nachweis einer HCMV- bzw. HHV6-Reaktivierung allein auf Grundlage des IgG-Antikörperverlaufes ist daher bei immunsupprimierten Patienten nicht möglich.

Die mit dem HHV6-IgG-Mikroblot gemessenen HHV6-IgG-Antikörperverläufe wiesen im Vergleich zu den HCMV-IgG-Antikörperverläufen eine Besonderheit auf. Während die HCMV-IgG-Antikörperverläufe der Patienten nach der HSZT durch mehrere HCMV-IgG-Antikörperanstiege und -abfälle gekennzeichnet waren, wiesen die HHV6-IgG-

Antikörperanstiege der sieben Patienten unabhängig vom positiven HHV6-PCR-Nachweis nur einen kurzen HHV6-IgG-Antikörperanstieg sowie einen nachfolgenden HHV6-IgG-Antikörperabfall auf. Da HHV6-Reaktivierungen kurz nach der HSZT (14-28 Tagen) und im Gegensatz zu HCMV-Reaktivierungen nur in einem kurzen Zeitfenster nachgewiesen werden, ist vermutlich nur für diesen begrenzten Zeitraum HHV6-Antigen als Trigger für die Antikörper produzierenden Plasmazellen verfügbar.

4.11 Reduktion der HCMV-Reaktivierung durch HCMV-positive Transplantatspender

Der HCMV-Serostatus des Empfängers und Spenders sind entscheidend für die HCMV-Infektion bzw. –Reaktivierung nach der hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSZT) [155]. Matthes-Martin et al. (2003) zeigten, dass HCMV-Reaktivierungen nach der HSZT bei HCMV-positiven Empfängern durch die Auswahl von HCMV-positiven Spendern reduziert werden können [92]. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass nur 50% der HCMV-positiven Patienten mit HCMV-positiven Transplantatspendern nach der HSZT eine positive HCMV-PCR aufwiesen. Dagegen konnte bei 90% der HCMV-positiven Patienten, die das Stammzelltransplantat von HCMV-negativen Transplantatspendern erhielten, eine positive HCMV-PCR nach HSZT nachgewiesen werden. Außerdem wurde ein Einfluss des HCMV-Serostatus des Transplantatspenders auf die IgG-Antikörperentwicklung der Patienten nach HSZT beobachtet werden. Vier von sechs Patienten (66,6%) mit HCMV-positiven Transplantatspendern und positiven HCMV-PCR-Nachweisen, aber nur drei von neun Patienten (33,3%) mit HCMV-negativen Transplantatspendern und positiven HCMV-PCR-Nachweisen zeigten nach der HSZT einen HCMV-IgG-Antikörperanstieg. Wie Boland et al. (1992) zeigten, konnten frühe HCMV-IgG-Antikörperanstiege bis zu 180 Tage nach der HSZT in dieser Arbeit überwiegend nur bei HCMV-positiven Patienten mit positiven HCMV-Transplantatspendern beobachtet werden [161]. 50% der HCMV-positiven Patienten mit positiven HCMV-Transplantatspendern wiesen unabhängig von positiven HCMV-PCR-Nachweisen 83-161 Tage nach der HSZT frühe IgG-Antikörperanstiege auf. Aber nur einer von zehn HCMV-positiven Patienten (10%) mit einem HCMV-negativen Transplantatempfänger und nachgewiesener HCMV-PCR zeigte 106 Tage nach HSZT einen HCMV-IgG-Antikörperanstieg. Frühe IgG-Antikörperanstiege bei Patienten mit HCMV-positiven Transplantatspendern sind wahrscheinlich durch die Übertragung von B-Gedächtniszellen sowie Plasmazellen verursacht [79, 80], da die ersten B-Lymphozyten erst drei Monate nach HSZT nachweisbar sind [74, 75] und erst sechs Monate nach der HSZT die ersten B-Lymphozyten den Isotypwechsel vollziehen können [74, 75]. Chemoradioresistente langlebige Plasmazellen können ebenfalls eine Ursache für die IgG-Antikörperproduktion nach der HSZT darstellen [78, 79], [81] und sind vermutlich die Ursache für die IgG-Antikörperanstiege bei Patienten mit HCMV-negativen

Transplantatspendern. Van Tol (1996) zeigten, dass 83% der Patienten noch Jahre nach HSZT eigene persistierende IgG-Antikörper aufwiesen [79]. Auch Gerritsen et al. (1993) konnten die von chemoradioresistenten Plasmazellen gebildeten Antikörper bis zu einem Jahr nach der Blutstammzelltransplantation nachweisen [81]. Mit dem HCMV-Mikroblot wurde bei 16 von 22 Patienten (72,7%) über mindestens 103 bis zu 521 Tage nach HSZT für mindestens zwei Antigene eine stetig gleichbleibende Antikörperreaktion dokumentiert. Möglicherweise ist dies ein Verweis für das Überleben von chemoradioresistenten Plasmazellen.

4.12 HCMV pp52-F1 Antigen-spezifische IgG-Antikörperreaktionen – möglicherweise ein Nachweis für HCMV-Reaktivierungen nach HSZT

Mit dem Mikroblot ist neben der Ermittlung des IgG-Antikörpertiters zusätzlich auch eine differenzierte Auswertung der IgG-Antikörperreaktionen möglich. So konnte bei vier Patienten mit HCMV-negativen Transplantatspendern eine Zunahme der HCMV pp52-F1 Antigen-spezifischen IgG-Antikörperreaktionen 58, 182, 224, 268 und 511 Tage nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSZT) beobachtet werden, wobei drei Patienten einen Abfall oder einen stabilen Antikörpertiter zeigten. Nur ein Patient wies 182 Tage nach der HSZT neben dem Anstieg der HCMV pp52-F1 Antigen-spezifischen IgG-Antikörper gleichzeitig einen Anstieg des IgG-Antikörpertiters auf. Weiterhin zeigten vier Patienten mit HCMV-positiven Transplantatspendern 83, 86, 98 und 273 Tage nach der HSZT ebenfalls eine Zunahme der HCMV pp52-F1 Antigen-spezifischen IgG-Antikörperreaktionen, wobei zwei Patienten gleichzeitig einen Anstieg der IgG-Antikörper aufwiesen. Das pp52-Protein wurde als Antigen für frühe Antikörper der HCMV-Infektion beschrieben [103]. Der Nachweis von IgG-Antikörpern gegen das HCMV pp52-F1-Antigen könnte trotz abfallendem oder stabilen HCMV IgG-Antikörpertiter auf eine HCMV-Reaktivierung hinweisen. Frühe HCMV pp52-F1 Antigen-spezifische IgG-Antikörperanstiege bei Patienten mit positiven Transplantatspendern (83, 86 und 98 Tage) könnten durch die Übertragung von B-Gedächtniszellen sowie Plasmazellen verursacht sein [79, 80]. Wie Lausen et al. (2004) zeigten, können die übertragenen B-Gedächtniszellen im Transplantationspatienten 9 Monate nach der Stammzelltransplantation nach erneutem Kontakt mit dem Antigen (Impfung) IgG-Antikörper sezernierende Plasmazellen bilden [80]. Der Nachweis dieser zunehmenden IgG-Antikörper könnte ein serologischer Nachweis für eine HCMV-Reaktivierung sein. Bei HCMV-positiven Patienten mit negativen Transplantatspendern sind frühe Anstiege der HCMV pp52-F1 Antigen-spezifischen IgG-Antikörper bis zu 180 Tage (58 Tage) nach HSZT wahrscheinlich durch chemoradioresistente B-Lymphozyten verursacht, die vermutlich auch einen IgG-Antikörperanstieg bei HCMV-positiven Patienten mit positiven Transplantatspendern verursachen könnten. HCMV

pp52-F1 Antigen-spezifische IgG-Antikörperanstiege über 180 Tage (182, 224, 268, 273 und 511 Tage) nach der HSZT sind dagegen wahrscheinlich durch die neu entwickelten, IgG sezernierenden B-Lymphozyten, die sich nach der HSZT aus den CD34⁺-Stammzellen des Spenders differenziert haben, bedingt. Wie Van Tol (1996) zeigte, haben 86,4% der Patienten 6 Monate nach der HSZT den IgG-Allotypus des Spenders übernommen [78, 79]. In einer weiteren Studie wäre es interessant, die HCMV Antigen-spezifischen IgG-Antikörperreaktionen der Stammzellspender mit den HCMV Antigen-spezifischen IgG-Antikörperreaktionen der Empfänger nach der Transplantation zu vergleichen. Möglicherweise kann man HCMV Antigen-spezifische Antikörperreaktionen, die beim Empfänger nach der Transplantation auftreten auch beim Spender finden. Dies könnte auf die Übertragung von Plasmazellen hinweisen.

4.13 Wechsel der Antigen-spezifischen IgG-Antikörpermuster 182, 204 und 283 Tage nach der HSZT

Drei Patienten mit einem HCMV negativen Transplantatspender wiesen 182, 204 sowie 283 Tage nach der HSZT einen Wechsel der HCMV Antigen-spezifischen IgG-Antikörpermuster auf, wobei zwei der drei Patienten gleichzeitig einen Anstieg des IgG-Antikörpertiters zeigten. Ein Patient hingegen wies einen gleichbleibenden IgG-Antikörpertiter auf. Der Wechsel der Antigen-spezifischen IgG-Antikörpermuster verweist auf die Bildung von neuen IgG-Antikörper sezernierenden B-Lymphozyten und lässt einen Wechsel der B-Lymphozytenpopulation vom Empfänger zum Spender vermuten. Auch Van Tol (1996) konnte zeigen, dass 86,4% der Patienten 6 Monate nach der HSZT den IgG-Allotypus des Spenders übernommen haben [78, 79]. Vermutlich haben sich die mit dem HCMV-IgG-Mikroblot neu nachweisbaren IgG-Antikörper sezernierenden B-Lymphozyten aus den übertragenen CD34⁺-Stammzellen des Transplantatspenders differenziert. Der Wechsel der B-Lymphozytenpopulation vom Empfänger zum Spender ab 6 Monate nach der HSZT ist für die Patienten ein wichtiger Schritt für die Rekonstitution der B-Lymphozyten. Mit dem HHV6-Mikroblot konnte ein Wechsel der HHV6 Antigen-spezifischen IgG-Antikörper nicht beobachtet werden.

4.14 Differenzierung der HHV6 A-Antigen- und HHV6 B-Antigen-spezifischen Antikörperreaktionen nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSZT)

Sieben von 17 Patienten wiesen unabhängig davon, ob für diese Patienten mittels PCR eine HHV6-Reaktivierung nachgewiesen wurde oder nicht, einen Anstieg des HHV6 IgG-Antikörpertiters auf. Alle sieben HHV6 IgG-Antikörperverläufe zeigten sowohl HHV6 A Antigen-spezifische als auch HHV6 B Antigen-spezifische Antikörperreaktionen, wobei vier

IgG-Antikörperverläufe durch eine deutliche Mehrheit an HHV6 B Antigen-spezifischen IgG-Antikörpern gekennzeichnet waren, die serologisch eine häufigere HHV6 B-Reaktivierung vermuten lassen. Die Mehrheit der erschienenen Studien beschrieben nach der HSZT ebenfalls häufiger HHV6 B-Reaktivierung. Sassenscheidt et al. (2006) konnten mit der Real-Time-PCR (RT-PCR) bei 22 Patienten nur HHV6 B-DNA im Plasma nach der HSZT nachweisen [147]. Auch Wang et al. (2006) und Reddy et al. (2005) wiesen mit RT-PCR bei 97% der HHV6-positiven Patienten nur HHV6 B-DNA in den peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) bzw. im Plasma nach der HSZT nach [154, 162]. Nur bei 3% der HHV6-positiven Patienten konnten sie im PBMC bzw. Plasma allein HHV6 A-DNA nachweisen. Kontrovers zu diesen drei Studien wiesen Nitsche et al. (2001) mit RT-PCR bei 80% der untersuchten Patienten im Plasma sowohl HHV6 A-DNA als auch HHV6 B-DNA nach HSZT nach [163]. Dass die Probenauswahl entscheidend für die Richtigkeit der Studie ist, konnten Nitsche et al. (2001) ebenfalls in der selben Studie zeigen, da bei 88% der Patienten nach HSZT in den PBMC nur HHV6 B-DNA nachgewiesen werden konnte [163]. Mit dieser Studie vergleichbar wiesen Cone et al. (1996) bei 64,7% der HSZT-Patienten im Lungengewebe HHV6 A- und B-DNA nach und zeigten vergleichbar zu Nitsche et al. (2001) eine Reaktivierung beider HHV6-Subtypen im Lungengewebe nach HSZT. Mit 29,4% der HSZT-Patienten, die im Lungengewebe nur HHV6 B-DNA aufwiesen, konnte Cone et al. (1996) ebenfalls eine deutlich häufigere HHV6 B-Reaktivierung zeigen. Nur 5,9% der Patienten wiesen im Lungengewebe allein HHV6 A-DNA auf [149]. Vollin et al. (2004) zeigten durch den Nachweis von HHV6 B-Antigenen in PBMC vier Tage nach der HSZT bei 62% der Patienten und durch den Nachweis von HHV6 A-Antigenen in PBMC 24 Tage nach der HSZT bei 33% der Patienten einen zeitlich unterschiedlichen Reaktivierungszeitpunkt der beiden HHV6-Subtypen auf [164]. Bei 65% der Patienten mit nachgewiesenen HHV6B-Antigenen in den PBMC wurden später ebenfalls HHV6 A-Antigene in den PBMC nachgewiesen. Da die HHV6-Antikörperanstiege durch eine Mehrheit von HHV6 B-Antigen-spezifischen IgG-Antikörpern bei vier von sieben Patienten gekennzeichnet waren und die HHV6 B-Antigen-spezifischen IgG-Antikörper im Antikörperanstieg eher sichtbar wurden, ist eine häufigere HHV6 B-Reaktivierung und ein früherer HHV6 B-Reaktivierungszeitpunkt zu vermuten. Die spätere HHV6 A-Reaktivierung führt wahrscheinlich zu einer zeitlich verzögerten HHV6 A-Antigen-spezifischen IgG-Antikörperbildung, die sich in den Antigen-spezifischen IgG-Antikörpermustern durch eine Mehrheit an HHV6 B-Antigen-spezifischen IgG-Antikörpern zeigt. Weitere Untersuchungen an einer größeren Patientenzahl nach HSZT mit dem HHV6-Mikroblot müssen folgen, um die Ergebnisse zu validieren. Weiterhin sollte überprüft werden, ob der gleichzeitige Nachweis von HHV6 A- und HHV6 B-Antigen-spezifischen IgG-Antikörpern durch gruppenspezifische kreuzreaktive Epitope der homologen Antigene bedingt ist.

5. Zusammenfassung, Ausblick und Perspektiven für die Mikrobロットechnologie

Die Durchseuchungsrate der Bevölkerung in Deutschland mit den humanen β -Herpesviren liegt zwischen 40 und 90%. Nach der Primärinfektion verbleiben die β -Herpesviren latent in den Körperzellen und haben die Fähigkeit, z.B. nach körperlichem Stress, bei Immunsuppression oder unter UV-Strahlung erneut in den lytischen Vermehrungszyklus einzutreten. Die kommerziell erhältlichen serologischen Methoden für die Diagnostik der humanen β -Herpesviren haben sich in den letzten Jahren wenig weiterentwickelt. Der enzymgekoppelte Immunadsorptionstest (ELISA) und der Immunfluoreszenztest (IFT) sind die Standardmethoden für die Diagnostik der humanen β -Herpesviren. Da bei der Bestimmung des IgM-Titers Kreuzreaktionen sowie falsch-positive oder falsch-negative Ergebnisse auftreten können, reicht der IgM-Titer als alleinige Aussage für die Diagnose einer akuten Infektion nicht aus. Weiterhin fehlt bei einer Superinfektion mit einem anderen Stamm des gleichen Virus oder im Falle einer Reaktivierung des Virus oft die IgM-Antwort. In diesen Fällen kann nur auf Grund des IgG-Titeranstieges eine Reaktivierung bzw. Superinfektion angenommen werden. Bei fehlender Immunkompetenz bleibt der Anstieg des IgG-Titers jedoch oft aus. Serologische ELISA-IgG-Tests und IFT-IgG-Tests auf der Basis von Mischantigenen für den Nachweis von HCMV- oder HHV6-Reaktivierungen zeigen bei immunsupprimierten Patienten zurückliegende Infektionen bzw. Reaktivierungen an. Kommerzielle Western Blots für den Nachweis von IgG-Antikörpern gegen „late antigens“ der Zytomegalieviren sind verfügbar, werden aber nur in Speziallaboratorien eingesetzt. Weiterhin ist eine Differenzierung der Subtypen HHV6 A und HHV6 B mit den kommerziell erhältlichen Methoden wie ELISA und IFT nicht möglich. Eine Unterscheidung der Subtypen HHV6 A und HHV6 B wäre aber auf Grund der Unterschiede in der Infektionsfähigkeit, im Replikationsmuster, in der Epidemiologie und der Pathogenität wünschenswert.

Im Rahmen des BMBF-Projektes Bioresponse (Projekträger Jülich: Förderkennzahl beim BMBF: 03WKR03E) und der nachfolgenden Stipendiatenförderung durch die Jürgen-Manchot-Stiftung wurden für eine differenzierte β -Herpesvirusdiagnostik auf Basis des Mikroblots je zehn HCMV- und HHV6-Antigene exprimiert und evaluiert. Die Mikrobロットechnologie - eine an Mikrowellplatten angepasste und miniaturisierte Form der Streifentesttechnologie - ermöglicht den simultanen Nachweis von bis zu zehn Antigen-spezifischen IgG-Antikörpern bei geringem Proben- und Reagenzienverbrauch. Von in der Literatur als antigen beschriebenen Strukturproteinen und Nichtstrukturproteinen der Betaherpesviren wurden Proteinbereiche mit und ohne bekannten Epitopen ausgewählt und als Fusionsproteine in BL-21 Zellen exprimiert. Jeweils zehn über die Ni-NTA-Agarose-Säule aufgereinigte virusspezifische Fusionsantigene wurden zur Herstellung der Mikroblots eingesetzt.

Der HCMV-IgG-Mikroblot und der HHV6-IgG-Mikroblot wiesen zu den kommerziell erhältlichen serologischen Testsystemen (HHV6-IgG-IFT von Euroimmun, Lübeck, HCMV-IgG-ELISA von Dade Behring, Marburg, HCMV-IgG-recom Blot von Mikrogen, Neuried) vergleichbare Sensitivitäten auf. Im Vergleich zum HHV6-IgG-ELISA (Panbio, Rüsselsheim) ist der HHV6-IgG-Mikroblot die empfindlichere Nachweismethode. Die Spezifität des HHV6-IgG-Mikroblots ist mit den HHV6-Testsystemen (HHV6-IgG-IFT von Euroimmun, Lübeck, HHV6-IgG-ELISA von Panbio, Rüsselsheim) vergleichbar. Weiterhin wies der HCMV-IgG-Mikroblot im Vergleich zum kommerziell erhältlichen HCMV-IgG-ELISA (Dade Behring, Marburg) und zum HCMV-IgG-recom Blot (Mikrogen, Neuried) eine Spezifität von 80% bzw. 83% auf.

Der Mikroblot hat sich als ein geeignetes diagnostisches Instrument erwiesen, um neben der Entwicklung des IgG-Antikörpertiters auch differenziert die Antigen-spezifischen IgG-Antikörperantworten unter bestimmten Fragestellungen zu untersuchen. So ermöglicht der HHV6-IgG-Mikroblot erstmals eine serologische Unterscheidung von HHV6 A und HHV6 B monovalenten Seren und den Nachweis von HHV6 A/ B polyvalenten Seren.

Die Mikroblottechnologie wurde primär für die serologische Testung von Seren und Plasmen etabliert. Mit dem HCMV-IgG-Mikroblot wäre aber auch eine Liquordiagnostik möglich. Jedoch konnte mit dem HHV6-IgG-Mikroblot vermutlich auf Grund nicht ausreichender Sensitivität eine Einsatzmöglichkeit in der Liquordiagnostik anhand dieser Arbeit wegen zu geringer Probenzahlen nicht gezeigt werden. In einer anschließenden Studie sollte dennoch die Eignung der HHV6-Antigene für die HHV6-Liquordiagnostik mit einem größeren Umfang an Liquores geprüft werden.

Stabilitätstestungen zeigten, dass die Messergebnisse von am gleichen Tag wiederholt gemessenen Seren oder Plasmen reproduzierbar waren. An verschiedenen Tagen gemessene Seren und Plasmen wiesen jedoch unterschiedliche Messergebnisse auf. Mögliche Ursachen für die geringe Reproduzierbarkeit der Messergebnisse im Mikroblot sind die unterschiedlichen Epitopdichten ein und desselben Antigens in den Mikroblots, die unspezifische Hintergrundfärbung in den Mikroblots sowie die nicht konstante bivalente Gleichgewichts- und Bindungskonstante der IgG-Antikörper im Mikroblot. In folgenden Studien sollte durch eine Optimierung des Proteintransfers der Antigene auf die Nitrozellulosemembran eine gleiche Epitopdichte gewährleistet werden. Gleichzeitig muss der Algorithmus der Software dahingehend verbessert werden, dass dieser trotz einer möglichen Verunreinigung der Mikroblots oder schwacher Hintergrundfärbung die Markerbande erkennt und eine Auswertung gewährleistet werden kann. Die unspezifische Hintergrundfärbung in den Mikroblots sollte nach Absprache mit dem Hersteller durch den Einsatz alternativer Blockreagenzien weitgehend reduziert werden. Weiterhin muss die Cutoff-Grenze so definiert werden, dass eine bestmögliche Sensitivität bei optimaler Spezifität der Mikroblotmethode ermöglicht wird. Dieser Cutoff kann sowohl durch die Anzahl

der reaktiven Antigene als auch durch die Färbungsstärke der Antigen-Antikörperreaktion mit einem spezifischen Antigen definiert werden.

In einem zweiten klinisch orientierten Teil dieser Arbeit wurden mit der Mikrobロットechnologie die HCMV- und HHV6-Antikörperantworten nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSZT) untersucht. Die HCMV- und HHV6-Antikörperverläufe der Patienten nach HSZT wiesen keinen Zusammenhang zwischen nachgewiesener Reaktivierung und IgG-Antikörperentwicklung auf. Der Nachweis einer HCMV- bzw. HHV6-Reaktivierung bzw. -Infektion nur auf Grundlage des IgG-Antikörpertiters ist bei immunsupprimierten Patienten daher nicht möglich. Es konnte nicht nach jeder positiven HCMV- bzw. HHV6-PCR ein IgG-Antikörperanstieg beobachtet werden, was vermutlich durch die Immunsuppression der Patienten bedingt war. Weiterhin konnten HCMV- bzw. HHV6-IgG-Antikörperanstiege selten zeitnah zu positiven HCMV- bzw. HHV6-PCR-Nachweisen gezeigt werden. Im Gegensatz dazu wurden bei weiteren Patienten mit HCMV- bzw. HHV6-positiven Transplantatspendern trotz negativer PCR frühe HCMV- bzw. HHV6-IgG-Antikörperanstiege bis zu 180 Tage nach der HSZT nachgewiesen. Diese frühen IgG-Antikörperanstiege sind wahrscheinlich durch die mit dem Stammzelltransplantat übertragenen B-Gedächtniszellen sowie Plasmazellen verursacht und tragen zur frühen Immunrestitution des Patienten bei. Chemoradioresistente langlebige Plasmazellen können ebenfalls eine Ursache für frühe IgG-Antikörperanstiege bis zu 180 Tage nach der HSZT bei HCMV-positiven Patienten mit negativen HCMV- bzw. HHV6-Transplantatspendern oder bei Patienten mit positiven HCMV- bzw. HHV6-Transplantatspendern darstellen.

Während die HCMV-IgG-Antikörperverläufe der Patienten nach der HSZT unabhängig von den positiven HCMV-PCR-Nachweisen durch mehrere HCMV-IgG-Antikörperanstiege und -abfälle gekennzeichnet waren, wiesen die HHV6-IgG-Antikörperverläufe unabhängig von den positiven HHV6-PCR-Nachweisen nur einen HHV6-IgG-Antikörperanstieg auf, der von einem HHV6-Antikörperabfall gefolgt wurde. Da HHV6-Reaktivierungen mit 14-28 Tagen kurz nach der HSZT und im Gegensatz zu HCMV-Reaktivierungen nur in einem kurzen Zeitfenster nachgewiesen wurden, ist vermutlich nur für diesen begrenzten Zeitraum HHV6-Antigen als Trigger für die Antikörper produzierenden Plasmazellen verfügbar. Ob gesunde Probanden nach einer HHV6-Infektion oder HHV6-Reaktivierung eine ähnliche Antikörperkinetik wie HSZT-Patienten aufweisen, sollte in einer Folgestudie untersucht werden.

Mit der Mikrobロットechnologie konnte ein Einfluss des HCMV-Serostatus vom Transplantatspender auf die HCMV-IgG-Antikörperentwicklung nach HSZT gezeigt werden. Überwiegend nur HCMV-positiv Patienten mit positiven HCMV-Transplantatspendern wiesen unabhängig von der HCMV-Reaktivierung frühe IgG-Antikörperanstiege bis zu 180 Tage nach der HSZT auf. Diese frühen IgG-Antikörperanstiege sind durch die mit dem Stammzelltransplantat übertragenen B-Gedächtniszellen oder Plasmazellen sowie seltener

durch chemoradioresistente Plasmazellen verursacht und können zu einer frühen Immunrekonstitution beitragen.

Im Gegensatz zu der kommerziell erhältlichen ELISA-Technik kann mit dem Mikroblood neben der Antikörperkinetik auch differenziert die Entwicklung der Antigen-spezifischen IgG-Antikörperreaktionen untersucht werden. So konnte bei sieben von 22 Patienten trotz Abfall des HCMV-Antikörpertiters bzw. stabilem HCMV-Antikörpertiter eine Zunahme von einzelnen HCMV Antigen-spezifischen IgG-Antikörpern nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation beobachtet werden. Diese einzelnen IgG-Antikörperanstiege könnten serologisch auf eine HCMV-Reaktivierung hinweisen.

Weiterhin konnte bei drei von zehn Patienten mit HCMV-negativen Transplantatspendern unabhängig vom HCMV-IgG-Antikörpertiter ein Wechsel der HCMV Antigen-spezifischen IgG-Antikörpermuster ab dem 6. Monat beobachtet werden. Der Wechsel der HCMV Antigen-spezifischen IgG-Antikörpermuster verweist auf die Bildung von neuen IgG-Antikörper sezernierenden B-Lymphozyten und vermutlich auf einen Wechsel der B-Lymphozytenpopulation vom Empfänger zum Spender. Der Wechsel der B-Lymphozytenpopulation vom Empfänger zum Spender ist für den Patienten ein wichtiger Schritt für die Rekonstitution der B-Lymphozyten nach HSZT. Mit dem HHV6-IgG-Mikroblood hingegen konnte ein Wechsel der Antigen-spezifischen IgG-Antikörper nicht beobachtet werden.

Eine Unterscheidung der HHV6-Subtypen auf serologischer Basis nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation wurde neu etabliert. Alle sieben mit dem HHV6-IgG-Mikroblood nachgewiesenen HHV6-IgG-Antikörperanstiege zeigten sowohl HHV6 A Antigen-spezifische, als auch HHV6 B Antigen-spezifische IgG-Antikörperreaktionen. Jedoch zeigten vier von sieben Antikörperverläufen überwiegend HHV6 B Antigen-spezifische IgG-Antikörperreaktionen. Weiterhin konnten HHV6 B Antigen-spezifische IgG-Antikörper früher als HHV6 A Antigen-spezifische IgG-Antikörper nachgewiesen werden. Auf Grund dieser Beobachtungen ist zu vermuten, dass der HHV6 B-Subtyp zu einem früheren Zeitpunkt und häufiger nach der HSZT als der HHV6 A-Subtyp reaktiviert.

6. Literatur

- 1 van Son, W. J. and The, T. H., Cytomegalovirus infection after organ transplantation: an update with special emphasis on renal transplantation. *Transpl Int* 1989. 2: 147-164.
- 2 Fishman, J. A., Emery, V., Freeman, R., Pascual, M., Rostaing, L., Schlitt, H. J., Sgarabotto, D., Torre-Cisneros, J. and Uknis, M. E., Cytomegalovirus in transplantation - challenging the status quo. *Clin Transplant* 2007. 21: 149-158.
- 3 Stocchi, R., Ward, K. N., Fanin, R., Bacarani, M. and Apperley, J. F., Management of human cytomegalovirus infection and disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Haematologica* 1999. 84: 71-79.
- 4 Ljungman, P., Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: viral status. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007. 20: 209-217.
- 5 Gerna, G. and Lilleri, D., Monitoring transplant patients for human cytomegalovirus: Diagnostic update. *Herpes* 2006. 13: 4-11.
- 6 Britt, W., Manifestations of human cytomegalovirus infection: proposed mechanisms of acute and chronic disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008. 325: 417-470.
- 7 Steininger, C., Clinical relevance of cytomegalovirus infection in patients with disorders of the immune system. *Clin Microbiol Infect* 2007. 13: 953-963.
- 8 Alford, C. A., Stagno, S., Pass, R. F. and Britt, W. J., Congenital and perinatal cytomegalovirus infections. *Rev Infect Dis* 1990. 12 Suppl 7: S745-753.
- 9 Landolfo, S., Gariglio, M., Gribaudo, G., Lembo, D., The human cytomegalovirus. *Pharmacology & Therapeutics* 2003. 98: 269-297.
- 10 Eastlund, T., Infectious disease transmission through cell, tissue, and organ transplantation: reducing the risk through donor selection. *Cell Transplant* 1995. 4: 455-477.
- 11 Blaha, M., Mericka, P., Zak, P., Stepanova, V., Vavra, L., Maly, J. and Tousovska, K., The risk of infection transmission from blood progenitor cell concentrates. *J Hematother Stem Cell Res* 2003. 12: 161-164.
- 12 Hurt, C. and Tammaro, D., Diagnostic evaluation of mononucleosis-like illnesses. *Am J Med* 2007. 120: 911 e911-918.
- 13 Pomeroy, C. and Englund, J. A., Cytomegalovirus: epidemiology and infection control. *Am J Infect Control* 1987. 15: 107-119.
- 14 Larsson, S., Soderberg-Naucler, C. and Moller, E., Productive cytomegalovirus (CMV) infection exclusively in CD13-positive peripheral blood mononuclear cells from CMV-infected individuals: implications for prevention of CMV transmission. *Transplantation* 1998. 65: 411-415.

- 15 Maciejewski, J. P. and St Jeor, S. C., Human cytomegalovirus infection of human hematopoietic progenitor cells. *Leuk Lymphoma* 1999. 33: 1-13.
- 16 Okuno, T., Takahashi, K., Balachandra, K., Shiraki, K., Yamanishi, K., Takahashi, M. and Baba, K., Seroepidemiology of human herpesvirus 6 infection in normal children and adults. *J Clin Microbiol* 1989. 27: 651-653.
- 17 Hall, C. B., Long, C. E., Schnabel, K. C., Caserta, M. T., McIntyre, K. M., Costanzo, M. A., Knott, A., Dewhurst, S., Insel, R. A. and Epstein, L. G., Human herpesvirus-6 infection in children. A prospective study of complications and reactivation. *N Engl J Med* 1994. 331: 432-438.
- 18 Yamanishi, K., Okuno, T., Shiraki, K., Takahashi, M., Kondo, T., Asano, Y. and Kurata, T., Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum. *Lancet* 1988. 1: 1065-1067.
- 19 Abdel-Haq, N. M. and Asmar, B. I., Human herpesvirus 6 (HHV6) infection. *Indian J Pediatr* 2004. 71: 89-96.
- 20 Dewhurst, S., McIntyre, K., Schnabel, K. and Hall, C. B., Human herpesvirus 6 (HHV-6) variant B accounts for the majority of symptomatic primary HHV-6 infections in a population of U.S. infants. *J Clin Microbiol* 1993. 31: 416-418.
- 21 Harnett, G. B., Farr, T. J., Pietroboni, G. R. and Bucens, M. R., Frequent shedding of human herpesvirus 6 in saliva. *J Med Virol* 1990. 30: 128-130.
- 22 Pereira, C. M., Gasparetto, P. F., Correa, M. E., Costa, F. F., de Almeida, O. P. and Barjas-Castro, M. L., Human herpesvirus 6 in oral fluids from healthy individuals. *Arch Oral Biol* 2004. 49: 1043-1046.
- 23 Aberle, S. W., Mandl, C. W., Kunz, C. and Popow-Kraupp, T., Presence of human herpesvirus 6 variants A and B in saliva and peripheral blood mononuclear cells of healthy adults. *J Clin Microbiol* 1996. 34: 3223-3225.
- 24 Ablashi, D. V., Balachandran, N., Josephs, S. F., Hung, C. L., Krueger, G. R., Kramarsky, B., Salahuddin, S. Z. and Gallo, R. C., Genomic polymorphism, growth properties, and immunologic variations in human herpesvirus-6 isolates. *Virology* 1991. 184: 545-552.
- 25 Aubin, J. T., Agut, H., Collandre, H., Yamanishi, K., Chandran, B., Montagnier, L. and Huraux, J. M., Antigenic and genetic differentiation of the two putative types of human herpes virus 6. *J Virol Methods* 1993. 41: 223-234.
- 26 Hall, C. B., Caserta, M. T., Schnabel, K. C., Long, C., Epstein, L. G., Insel, R. A. and Dewhurst, S., Persistence of human herpesvirus 6 according to site and variant: possible greater neurotropism of variant A. *Clin Infect Dis* 1998. 26: 132-137.
- 27 Dominguez, G., Dambaugh, T. R., Stamey, F. R., Dewhurst, S., Inoue, N. and Pellett, P. E., Human herpesvirus 6B genome sequence: coding content and comparison with human herpesvirus 6A. *J Virol* 1999. 73: 8040-8052.
- 28 Lusso, P., Malnati, M., De Maria, A., Balotta, C., DeRocco, S. E., Markham, P. D. and Gallo, R. C., Productive infection of CD4+ and CD8+ mature human T cell populations and clones by human herpesvirus 6. Transcriptional down-regulation of CD3. *J Immunol* 1991. 147: 685-691.

- 29 Lusso, P., HHV-6 and the immune system: mechanisms of immunomodulation and viral escape. *J Clin Virol* 2006. 37 Suppl 1: S4-10.
- 30 Lusso, P., De Maria, A., Malnati, M., Lori, F., DeRocco, S. E., Baseler, M. and Gallo, R. C., Induction of CD4 and susceptibility to HIV-1 infection in human CD8+ T lymphocytes by human herpesvirus 6. *Nature* 1991. 349: 533-535.
- 31 Ahlqvist, J., Fotheringham, J., Akhyani, N., Yao, K., Fogdell-Hahn, A. and Jacobson, S., Differential tropism of human herpesvirus 6 (HHV-6) variants and induction of latency by HHV-6A in oligodendrocytes. *J Neurovirol* 2005. 11: 384-394.
- 32 Drobyski, W. R., Knox, K. K., Majewski, D. and Carrigan, D. R., Brief report: fatal encephalitis due to variant B human herpesvirus-6 infection in a bone marrow-transplant recipient. *N Engl J Med* 1994. 330: 1356-1360.
- 33 Tejada-Simon, M. V., Zang, Y. C., Hong, J., Rivera, V. M. and Zhang, J. Z., Cross-reactivity with myelin basic protein and human herpesvirus-6 in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2003. 53: 189-197.
- 34 Ozaki, Y., Tajiri, H., Tanaka-Taya, K., Mushiake, S., Kimoto, A., Yamanishi, K. and Okada, S., Frequent detection of the human herpesvirus 6-specific genomes in the livers of children with various liver diseases. *J Clin Microbiol* 2001. 39: 2173-2177.
- 35 Wiersbitzky, S., Eberle, J., Bruns, R., Weidemeier, H., Bittner, S., Dorn, U., Frick, G., Abel, E., Ladstatter, L. and Deinhardt, F., [Seroprevalence of antibodies to human herpesvirus 6 (exanthema subitum; critical 3-day fever-exanthema in young children) in the population of Northern Germany]. *Kinderarztl Prax* 1991. 59: 170-173.
- 36 Kondo, K., Kondo, T., Okuno, T., Takahashi, M. and Yamanishi, K., Latent human herpesvirus 6 infection of human monocytes/macrophages. *J Gen Virol* 1991. 72 (Pt 6): 1401-1408.
- 37 Luppi, M., Barozzi, P., Morris, C., Maiorana, A., Garber, R., Bonacorsi, G., Donelli, A., Marasca, R., Tabilio, A. and Torelli, G., Human herpesvirus 6 latently infects early bone marrow progenitors in vivo. *J Virol* 1999. 73: 754-759.
- 38 Torelli, G., Barozzi, P., Marasca, R., Cocconcelli, P., Merelli, E., Ceccherini-Nelli, L., Ferrari, S. and Luppi, M., Targeted integration of human herpesvirus 6 in the p arm of chromosome 17 of human peripheral blood mononuclear cells in vivo. *J Med Virol* 1995. 46: 178-188.
- 39 Tanaka-Taya, K., Sashihara, J., Kurahashi, H., Amo, K., Miyagawa, H., Kondo, K., Okada, S. and Yamanishi, K., Human herpesvirus 6 (HHV-6) is transmitted from parent to child in an integrated form and characterization of cases with chromosomally integrated HHV-6 DNA. *J Med Virol* 2004. 73: 465-473.
- 40 Ward, K. N., Leong, H. N., Nacheva, E. P., Howard, J., Atkinson, C. E., Davies, N. W., Griffiths, P. D. and Clark, D. A., Human herpesvirus 6 chromosomal integration in immunocompetent patients results in high levels of viral DNA in blood, sera, and hair follicles. *J Clin Microbiol* 2006. 44: 1571-1574.

- 41 Daibata, M., Taguchi, T., Nemoto, Y., Taguchi, H. and Miyoshi, I., Inheritance of chromosomally integrated human herpesvirus 6 DNA. *Blood* 1999. 94: 1545-1549.
- 42 Adams, O., Krempe, C., Kogler, G., Wernet, P. and Scheid, A., Congenital infections with human herpesvirus 6. *J Infect Dis* 1998. 178: 544-546.
- 43 Hall, C. B., Caserta, M. T., Schnabel, K. C., Boettrich, C., McDermott, M. P., Lofthus, G. K., Carnahan, J. A. and Dewhurst, S., Congenital infections with human herpesvirus 6 (HHV6) and human herpesvirus 7 (HHV7). *J Pediatr* 2004. 145: 472-477.
- 44 Lau, Y. L., Peiris, M., Chan, G. C., Chan, A. C., Chiu, D. and Ha, S. Y., Primary human herpes virus 6 infection transmitted from donor to recipient through bone marrow infusion. *Bone Marrow Transplant* 1998. 21: 1063-1066.
- 45 Potenza, L., Luppi, M., Barozzi, P., Rossi, G., Cocchi, S., Codeluppi, M., Pecorari, M., Masetti, M., Di Benedetto, F., Gennari, W., Portolani, M., Gerunda, G. E., Lazzarotto, T., Landini, M. P., Schulz, T. F., Torelli, G. and Guaraldi, G., HHV-6A in syncytial giant-cell hepatitis. *N Engl J Med* 2008. 359: 593-602.
- 46 Dockrell, D. H. and Paya, C. V., Human herpesvirus-6 and -7 in transplantation. *Rev Med Virol* 2001. 11: 23-36.
- 47 Yoshikawa, T., Asano, Y., Ihira, M., Suzuki, K., Ohashi, M., Suga, S., Kudo, K., Horibe, K., Kojima, S., Kato, K., Matsuyama, T. and Nishiyama, Y., Human herpesvirus 6 viremia in bone marrow transplant recipients: clinical features and risk factors. *J Infect Dis* 2002. 185: 847-853.
- 48 Clark, D. A., Nacheva, E. P., Leong, H. N., Brazma, D., Li, Y. T., Tsao, E. H., Buyck, H. C., Atkinson, C. E., Lawson, H. M., Potter, M. N. and Griffiths, P. D., Transmission of integrated human herpesvirus 6 through stem cell transplantation: implications for laboratory diagnosis. *J Infect Dis* 2006. 193: 912-916.
- 49 Caserta, M. T., Hall, C. B., Schnabel, K., Long, C. E. and D'Heron, N., Primary human herpesvirus 7 infection: a comparison of human herpesvirus 7 and human herpesvirus 6 infections in children. *J Pediatr* 1998. 133: 386-389.
- 50 Huang, L. M., Lee, C. Y., Liu, M. Y. and Lee, P. I., Primary infections of human herpesvirus-7 and herpesvirus-6: a comparative, longitudinal study up to 6 years of age. *Acta Paediatr* 1997. 86: 604-608.
- 51 Tanaka, K., Kondo, T., Torigoe, S., Okada, S., Mukai, T. and Yamanishi, K., Human herpesvirus 7: another causal agent for roseola (exanthem subitum). *J Pediatr* 1994. 125: 1-5.
- 52 Torigoe, S., Koide, W., Yamada, M., Miyashiro, E., Tanaka-Taya, K. and Yamanishi, K., Human herpesvirus 7 infection associated with central nervous system manifestations. *J Pediatr* 1996. 129: 301-305.
- 53 van den Berg, J. S., van Zeijl, J. H., Rotteveel, J. J., Melchers, W. J., Gabreels, F. J. and Galama, J. M., Neuroinvasion by human herpesvirus type 7 in a case of exanthem subitum with severe neurologic manifestations. *Neurology* 1999. 52: 1077-1079.

- 54 Mirandola, P., Secchiero, P., Pierpaoli, S., Visani, G., Zamai, L., Vitale, M., Capitani, S. and Zauli, G., Infection of CD34(+) hematopoietic progenitor cells by human herpesvirus 7 (HHV-7). *Blood* 2000. 96: 126-131.
- 55 Di Luca, D., Mirandola, P., Ravaoli, T., Dolcetti, R., Frigatti, A., Bovenzi, P., Sighinolfi, L., Monini, P. and Cassai, E., Human herpesviruses 6 and 7 in salivary glands and shedding in saliva of healthy and human immunodeficiency virus positive individuals. *J Med Virol* 1995. 45: 462-468.
- 56 Ward, K. N., Human herpesviruses-6 and -7 infections. *Curr Opin Infect Dis* 2005. 18: 247-252.
- 57 Fujisaki, H., Tanaka-Taya, K., Tanabe, H., Hara, T., Miyoshi, H., Okada, S. and Yamanishi, K., Detection of human herpesvirus 7 (HHV-7) DNA in breast milk by polymerase chain reaction and prevalence of HHV-7 antibody in breast-fed and bottle-fed children. *J Med Virol* 1998. 56: 275-279.
- 58 Wyatt, L. S., Rodriguez, W. J., Balachandran, N. and Frenkel, N., Human herpesvirus 7: antigenic properties and prevalence in children and adults. *J Virol* 1991. 65: 6260-6265.
- 59 Ahlqvist, J., Donati, D., Martinelli, E., Akhyani, N., Hou, J., Major, E. O., Jacobson, S. and Fogdell-Hahn, A., Complete replication cycle and acquisition of tegument in nucleus of human herpesvirus 6A in astrocytes and in T-cells. *J Med Virol* 2006. 78: 1542-1553.
- 60 Kidd, I. M., Clark, D. A., Bremner, J. A., Pillay, D., Griffiths, P. D. and Emery, V. C., A multiplex PCR assay for the simultaneous detection of human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7, with typing of HHV-6 by enzyme cleavage of PCR products. *J Virol Methods* 1998. 70: 29-36.
- 61 Safronetz, D., Humar, A. and Tipples, G. A., Differentiation and quantitation of human herpesviruses 6A, 6B and 7 by real-time PCR. *J Virol Methods* 2003. 112: 99-105.
- 62 Suga, S., Yazaki, T., Kajita, Y., Ozaki, T. and Asano, Y., Detection of human herpesvirus 6 DNAs in samples from several body sites of patients with exanthem subitum and their mothers by polymerase chain reaction assay. *J Med Virol* 1995. 46: 52-55.
- 63 Achour, A., Boutolleau, D., Slim, A., Agut, H. and Gautheret-Dejean, A., Human herpesvirus-6 (HHV-6) DNA in plasma reflects the presence of infected blood cells rather than circulating viral particles. *J Clin Virol* 2007. 38: 280-285.
- 64 Achour, A., Boutolleau, D., Gautheret-Dejean, A. and Agut, H., Is human herpesvirus-6 DNA in plasma the right marker for active infection? *J Infect Dis* 2006. 194: 1795-1796; author reply 1796-1797.
- 65 Norton, R. A., Caserta, M. T., Hall, C. B., Schnabel, K., Hocknell, P. and Dewhurst, S., Detection of human herpesvirus 6 by reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 1999. 37: 3672-3675.
- 66 Boutolleau, D., Agut, H. and Gautheret-Dejean, A., Human herpesvirus 6 genome integration: a possible cause of misdiagnosis of active viral infection? *J Infect Dis* 2006. 194: 1019-1020; author reply 1021-1013.

- 67 Irving, W. L., Ratnamohan, V. M., Hueston, L. C., Chapman, J. R. and Cunningham, A. L., Dual antibody rises to cytomegalovirus and human herpesvirus type 6: frequency of occurrence in CMV infections and evidence for genuine reactivity to both viruses. *J Infect Dis* 1990. 161: 910-916.
- 68 Manz, R. A., Thiel, A. and Radbruch, A., Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature* 1997. 388: 133-134.
- 69 Manz, R. A. and Radbruch, A., Plasma cells for a lifetime? *Eur J Immunol* 2002. 32: 923-927.
- 70 Manz, R. A., Lohning, M., Cassese, G., Thiel, A. and Radbruch, A., Survival of long-lived plasma cells is independent of antigen. *Int Immunol* 1998. 10: 1703-1711.
- 71 Slifka, M. K., Antia, R., Whitmire, J. K. and Ahmed, R., Humoral immunity due to long-lived plasma cells. *Immunity* 1998. 8: 363-372.
- 72 Sanz, I., Wei, C., Lee, F. E. and Anolik, J., Phenotypic and functional heterogeneity of human memory B cells. *Semin Immunol* 2008. 20: 67-82.
- 73 Schitteck, B. and Rajewsky, K., Maintenance of B-cell memory by long-lived cells generated from proliferating precursors. *Nature* 1990. 346: 749-751.
- 74 Geddes, M. and Storek, J., Immune reconstitution following hematopoietic stem-cell transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007. 20: 329-348.
- 75 Avanzini, M. A., Locatelli, F., Dos Santos, C., Maccario, R., Lenta, E., Oliveri, M., Giebel, S., De Stefano, P., Rossi, F., Giorgiani, G., Amendola, G., Telli, S. and Marconi, M., B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation: functional immaturity and slow recovery of memory CD27+ B cells. *Exp Hematol* 2005. 33: 480-486.
- 76 Atkinson, K., Hansen, J. A., Storb, R., Goehle, S., Goldstein, G. and Thomas, E. D., T-cell subpopulations identified by monoclonal antibodies after human marrow transplantation. I. Helper-inducer and cytotoxic-suppressor subsets. *Blood* 1982. 59: 1292-1298.
- 77 Storek, J., Joseph, A., Espino, G., Dawson, M. A., Douek, D. C., Sullivan, K. M., Flowers, M. E., Martin, P., Mathioudakis, G., Nash, R. A., Storb, R., Appelbaum, F. R. and Maloney, D. G., Immunity of patients surviving 20 to 30 years after allogeneic or syngeneic bone marrow transplantation. *Blood* 2001. 98: 3505-3512.
- 78 Casorati, G., Locatelli, F., Pagani, S., Garavaglia, C., Montini, E., Lisini, D., Turin, I., Rossi, F., Dellabona, P., Maccario, R. and Montagna, D., Bone marrow-resident memory T cells survive pretransplant chemotherapy and contribute to early immune reconstitution of patients with acute myeloid leukemia given mafosfamide-purged autologous bone marrow transplantation. *Exp Hematol* 2005. 33: 212-218.
- 79 van Tol, M. J., Gerritsen, E. J., de Lange, G. G., van Leeuwen, A. M., Jol-van der Zijde, C. M., Oudemans-Gruber, N. J., de Vries, E., Radl, J. and Vossen, J. M., The origin of IgG production and homogeneous IgG components after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1996. 87: 818-826.

- 80 Lausen, B. F., Hougs, L., Schejbel, L., Heilmann, C. and Barington, T., Human memory B cells transferred by allogeneic bone marrow transplantation contribute significantly to the antibody repertoire of the recipient. *J Immunol* 2004. 172: 3305-3318.
- 81 Gerritsen, E. J., van Tol, M. J., Lankester, A. C., van der Weijden-Ragas, C. P., Jol-van der Zijde, C. M., Oudemans-Gruber, N. J., Radl, J. and Vossen, J. M., Immunoglobulin levels and monoclonal gammopathies in children after bone marrow transplantation. *Blood* 1993. 82: 3493-3502.
- 82 Storek, J., Dawson, M. A., Storer, B., Stevens-Ayers, T., Maloney, D. G., Marr, K. A., Witherspoon, R. P., Bensinger, W., Flowers, M. E., Martin, P., Storb, R., Appelbaum, F. R. and Boeckh, M., Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation. *Blood* 2001. 97: 3380-3389.
- 83 Hentrich, M., Oruzio, D., Jager, G., Schlemmer, M., Schleuning, M., Schiel, X., Hiddemann, W. and Kolb, H. J., Impact of human herpesvirus-6 after haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2005. 128: 66-72.
- 84 Enright, H., Haake, R., Weisdorf, D., Ramsay, N., McGlave, P., Kersey, J., Thomas, W., McKenzie, D. and Miller, W., Cytomegalovirus pneumonia after bone marrow transplantation. Risk factors and response to therapy. *Transplantation* 1993. 55: 1339-1346.
- 85 Furlini, G., Vignoli, M., Ramazzotti, E., Re, M. C., Visani, G. and La, P., A concurrent human herpesvirus-6 infection renders two human hematopoietic progenitor (TF-1 and KG-1) cell lines susceptible to human immunodeficiency virus type-1. *Blood* 1996. 87: 4737-4745.
- 86 Sindre, H., Tjoonfjord, G. E., Rollag, H., Ranneberg-Nilsen, T., Veiby, O. P., Beck, S., Degre, M. and Hestdal, K., Human cytomegalovirus suppression of and latency in early hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1996. 88: 4526-4533.
- 87 de Pagter, P. J., Schuurman, R., Meijer, E., van Baarle, D., Sanders, E. A. and Boelens, J. J., Human herpesvirus type 6 reactivation after haematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Virol* 2008. 43: 361-366.
- 88 Kadakia, M. P., Rybka, W. B., Stewart, J. A., Patton, J. L., Stamey, F. R., Elsayy, M., Pellett, P. E. and Armstrong, J. A., Human herpesvirus 6: infection and disease following autologous and allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1996. 87: 5341-5354.
- 89 Clark, D. A., Human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7: emerging pathogens in transplant patients. *Int J Hematol* 2002. 76 Suppl 2: 246-252.
- 90 Meyers, J. D., Flournoy, N. and Thomas, E. D., Risk factors for cytomegalovirus infection after human marrow transplantation. *J Infect Dis* 1986. 153: 478-488.
- 91 Nichols, W. G., Corey, L., Gooley, T., Davis, C. and Boeckh, M., High risk of death due to bacterial and fungal infection among cytomegalovirus (CMV)-seronegative recipients of stem cell transplants from seropositive donors: evidence for indirect effects of primary CMV infection. *J Infect Dis* 2002. 185: 273-282.

- 92 Matthes-Martin, S., Lion, T., Aberle, S. W., Fritsch, G., Lawitschka, A., Bittner, B., Frommlet, F., Gadner, H. and Peters, C., Pre-emptive treatment of CMV DNAemia in paediatric stem cell transplantation: the impact of recipient and donor CMV serostatus on the incidence of CMV disease and CMV-related mortality. *Bone Marrow Transplant* 2003. 31: 803-808.
- 93 Ogata, M., Kikuchi, H., Satou, T., Kawano, R., Ikewaki, J., Kohno, K., Kashima, K., Ohtsuka, E. and Kadota, J., Human herpesvirus 6 DNA in plasma after allogeneic stem cell transplantation: incidence and clinical significance. *J Infect Dis* 2006. 193: 68-79.
- 94 Bonon, S. H., Rossi, C. L., de Souza, C. A., Vigorito, A. C. and Costa, S. C., Comparison of serology, antigenemia assay and the polymerase chain reaction for monitoring active cytomegalovirus infections in hematopoietic stem cell transplantation patients. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2006. 48: 275-278.
- 95 Yakushiji, K., Gondo, H., Kamezaki, K., Shigematsu, K., Hayashi, S., Kuroiwa, M., Taniguchi, S., Ohno, Y., Takase, K., Numata, A., Aoki, K., Kato, K., Nagafuji, K., Shimoda, K., Okamura, T., Kinukawa, N., Kasuga, N., Sata, M. and Harada, M., Monitoring of cytomegalovirus reactivation after allogeneic stem cell transplantation: comparison of an antigenemia assay and quantitative real-time polymerase chain reaction. *Bone Marrow Transplant* 2002. 29: 599-606.
- 96 Çelebi Harika, K. D., Özhan Murat, Beksaç Meral, Cytomegalovirus antigenemia is observed more frequently following allogeneic peripheral blood stem cell transplantation compared to bone marrow transplantation. *Turk J Hematol* 2006. 23: 104-110.
- 97 Patel, S. R., Ridwan, R. U. and Ortin, M., Cytomegalovirus reactivation in pediatric hemopoietic progenitors transplant: a retrospective study on the risk factors and the efficacy of treatment. *J Pediatr Hematol Oncol* 2005. 27: 411-415.
- 98 Ripalti, A., Ruan, Q., Bocconi, M. C., Campanini, F., Bergamini, G. and Landini, M. P., Construction of polyepitope fusion antigens of human cytomegalovirus ppUL32: reactivity with human antibodies. *J Clin Microbiol* 1994. 32: 358-363.
- 99 Speckner, A., Glykofrydes, D., Ohlin, M. and Mach, M., Antigenic domain 1 of human cytomegalovirus glycoprotein B induces a multitude of different antibodies which, when combined, results in incomplete virus neutralization. *J Gen Virol* 1999. 80 (Pt 8): 2183-2191.
- 100 Schoppel, K., Hassfurth, E., Britt, W., Ohlin, M., Borrebaeck, C. A. and Mach, M., Antibodies specific for the antigenic domain 1 of glycoprotein B (gpUL55) of human cytomegalovirus bind to different substructures. *Virology* 1996. 216: 133-145.
- 101 Takahashi, I., Sugiura, S., Ohta, H., Ozawa, K. and Kamiya, T., Epitope analysis of antibodies in Japanese to human cytomegalovirus phosphoprotein 150 with synthetic peptides. *Biosci Biotechnol Biochem* 2002. 66: 2402-2405.
- 102 Novak, J., Sova, P., Krchnak, V., Hamsikova, E., Zavadova, H. and Roubal, J., Mapping of serologically relevant regions of human cytomegalovirus phosphoprotein pp150 using synthetic peptides. *J Gen Virol* 1991. 72 (Pt 6): 1409-1413.

- 103 Greijer, A. E., van de Crommert, J. M., Stevens, S. J. and Middeldorp, J. M., Molecular fine-specificity analysis of antibody responses to human cytomegalovirus and design of novel synthetic-peptide-based serodiagnostic assays. *J Clin Microbiol* 1999. 37: 179-188.
- 104 Plachter, B., Klages, S., Hagelmann, S., Britt, W., Landini, M. P. and Jahn, G., Prokaryotic expression of phosphorylated tegument protein pp65 of human cytomegalovirus and application of recombinant peptides for immunoblot analyses. *J Clin Microbiol* 1990. 28: 1229-1235.
- 105 Ohlin, M., Plachter, B., Sundqvist, V. A., Steenbakkers, P. G., Middeldorp, J. M. and Borrebaeck, C. A., Human antibody reactivity against the lower matrix protein (pp65) produced by cytomegalovirus. *Clin Diagn Lab Immunol* 1995. 2: 325-329.
- 106 Pellett, P. E., Sanchez-Martinez, D., Dominguez, G., Black, J. B., Anton, E., Greenamoyer, C. and Dambaugh, T. R., A strongly immunoreactive virion protein of human herpesvirus 6 variant B strain Z29: identification and characterization of the gene and mapping of a variant-specific monoclonal antibody reactive epitope. *Virology* 1993. 195: 521-531.
- 107 Hampar, B., Derge, J. G., Martos, L. M. and Walker, J. L., Synthesis of Epstein-Barr virus after activation of the viral genome in a "virus-negative" human lymphoblastoid cell (Raji) made resistant to 5-bromodeoxyuridine (thymidine kinase-virus antigen-immunofluorescence-herpesvirus fingerprints). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1972. 69: 78-82.
- 108 Takeda, K., Okuno, T., Isegawa, Y. and Yamanishi, K., Identification of a variant A-specific neutralizing epitope on glycoprotein B (gB) of human herpesvirus-6 (HHV-6). *Virology* 1996. 222: 176-183.
- 109 Isegawa, Y., Mukai, T., Nakano, K., Kagawa, M., Chen, J., Mori, Y., Sunagawa, T., Kawanishi, K., Sashihara, J., Hata, A., Zou, P., Kosuge, H. and Yamanishi, K., Comparison of the complete DNA sequences of human herpesvirus 6 variants A and B. *J Virol* 1999. 73: 8053-8063.
- 110 Olsnes, S., Toxic proteins inhibiting protein synthesis. *Naturwissenschaften* 1972. 59: 497-502.
- 111 Hoffmann, F. and Rinas, U., Kinetics of heat-shock response and inclusion body formation during temperature-induced production of basic fibroblast growth factor in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog* 2000. 16: 1000-1007.
- 112 Schweder, T., Lin, H. Y., Jurgen, B., Breitenstein, A., Riemschneider, S., Khalameyzer, V., Gupta, A., Buttner, K. and Neubauer, P., Role of the general stress response during strong overexpression of a heterologous gene in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2002. 58: 330-337.
- 113 Rinas, U., Synthesis rates of cellular proteins involved in translation and protein folding are strongly altered in response to overproduction of basic fibroblast growth factor by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog* 1996. 12: 196-200.

- 114 Gill, R. T., Valdes, J. J. and Bentley, W. E., A comparative study of global stress gene regulation in response to overexpression of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Metab Eng* 2000. 2: 178-189.
- 115 Enfors, S. O., Control of in vivo proteolysis in the production of recombinant proteins. *Trends Biotechnol* 1992. 10: 310-315.
- 116 Georgiou, G. and Valax, P., Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* 1996. 7: 190-197.
- 117 Kurland, C. G. and Dong, H., Bacterial growth inhibition by overproduction of protein. *Mol Microbiol* 1996. 21: 1-4.
- 118 Borsig, L., Berger, E. G. and Malissard, M., Expression and purification of His-tagged beta-1,4-galactosyltransferase in yeast and in COS cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997. 240: 586-589.
- 119 Bolt, M. W. and Mahoney, P. A., High-efficiency blotting of proteins of diverse sizes following sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* 1997. 247: 185-192.
- 120 Ramos-Vara, J. A., Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol* 2005. 42: 405-426.
- 121 Taylor, C. R. and Levenson, R. M., Quantification of immunohistochemistry--issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II. *Histopathology* 2006. 49: 411-424.
- 122 Allner, R., Fibrinogen as a source of interference in heterogeneous enzyme immunoassays. *J Clin Chem Clin Biochem*. 1985. 23: 231-240.
- 123 Tate, J. and Ward, G., Interferences in immunoassay. *Clin Biochem Rev* 2004. 25: 105-120.
- 124 Derfuss, T., Hohlfeld, R. and Meinl, E., Intrathecal antibody (IgG) production against human herpesvirus type 6 occurs in about 20% of multiple sclerosis patients and might be linked to a polyspecific B-cell response. *J Neurol* 2005. 252: 968-971.
- 125 Sawada, J., Nakatani-Enomoto, S., Aizawa, H., Katayama, T., Ito, T., Aburakawa, Y. and Kikuchi, K., An adult case of relapsing human herpesvirus-6 encephalitis. *Intern Med* 2007. 46: 1617-1620.
- 126 Tardy-Panit, M., Michelson, S. and Horodniceanu, F., Immunofluorescence technique for detection of human cytomegalovirus (HCMV) antibodies against HCMV-induced late antigens with elimination of immunoglobulin G-receptor staining. *J Clin Microbiol* 1980. 11: 717-719.
- 127 Cleghorn, F. R., Maybank, K. A., Jack, N., Pate, E., Mingle, J., Levine, P. H. and Manns, A., Comparison of HHV-6 antibody titers in West Africa and the Caribbean. *Ann Epidemiol* 1995. 5: 497-500.
- 128 Chandran, B., Tirawatnapong, S., Pfeiffer, B. and Ablashi, D. V., Antigenic relationships among human herpesvirus-6 isolates. *J Med Virol* 1992. 37: 247-254.

- 129 Lin, W., Kasamatsu, H., On the Electrotransfer of Polypeptides from Gels to Nitrocellulose Membranes. *Anal Biochem* 1983. 128: 302-311.
- 130 Underwood, P. A., Problems and pitfalls with measurement of antibody affinity using solid phase binding in the ELISA. *J Immunol Methods* 1993. 164: 119-130.
- 131 Mattes, M. J., Binding parameters of antibodies reacting with multivalent antigens: functional affinity or pseudo-affinity. *J Immunol Methods* 1997. 202: 97-101.
- 132 Zhang, H., Williams, P. S., Zborowski, M. and Chalmers, J. J., Binding affinities/avidities of antibody-antigen interactions: quantification and scale-up implications. *Biotechnol Bioeng* 2006. 95: 812-829.
- 133 Kaufman, E. N. and Jain, R. K., Effect of bivalent interaction upon apparent antibody affinity: experimental confirmation of theory using fluorescence photobleaching and implications for antibody binding assays. *Cancer Res* 1992. 52: 4157-4167.
- 134 Miller, H., McCulloch, B., Landini, M. P. and Rossier, E., Comparison of immunoblotting with other serological methods and virus isolation for the early detection of primary cytomegalovirus infection in allograft recipients. *J Clin Microbiol* 1989. 27: 2672-2677.
- 135 Cone, R. W., Huang, M. L., Ashley, R. and Corey, L., Human herpesvirus 6 DNA in peripheral blood cells and saliva from immunocompetent individuals. *J Clin Microbiol* 1993. 31: 1262-1267.
- 136 Cermelli, C. a. J. S., Expert Working Group on HHV-6 and HHV 7 Laboratory Diagnosis and Testing. *Canada Communicable Disease Report* 2000. 26S4.
- 137 Rajcani, J. and Yanagihara, R., High serum antibody titers to human herpesvirus-6 in Melanesian population. *Acta Virol* 1994. 38: 121-123.
- 138 De Bolle, L., Naesens, L. and De Clercq, E., Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy. *Clin Microbiol Rev* 2005. 18: 217-245.
- 139 Zerr, D. M., Meier, A. S., Selke, S. S., Frenkel, L. M., Huang, M. L., Wald, A., Rhoads, M. P., Nguy, L., Bornemann, R., Morrow, R. A. and Corey, L., A population-based study of primary human herpesvirus 6 infection. *N Engl J Med* 2005. 352: 768-776.
- 140 Cermelli, C., Moroni, A., Pietrosevoli, P., Pecorari, M. and Portolani, M., IgG antibodies to human herpesvirus-6 (HHV-6) in Italian people. *Microbiologica* 1992. 15: 57-63.
- 141 Bhattarakosol, P., Pancharoen, C., Mekmullica, J., Bhattarakosol, P., Seroprevalence of Anti-Human Herpesvirus-6 IgG Antibody in Children of Bangkok, Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2001. 32: 143-147.
- 142 Alessio, L. A., Carricart, S. E., Bustos, D., Nates, S. V., Gendelman, H. and Pavan, J. V., Loss of maternally derived human herpesvirus-6 immunity and natural infection in Argentinian infants. *Int J Infect Dis* 2001. 5: 202-204.

- 143 Enders, G., Biber, M., Meyer, G. and Helftenbein, E., Prevalence of antibodies to human herpesvirus 6 in different age groups, in children with exanthema subitum, other acute exanthematous childhood diseases, Kawasaki syndrome, and acute infections with other herpesviruses and HIV. *Infection* 1990. 18: 12-15.
- 144 Yanagi, K., Harada, S., Ban, F., Oya, A., Okabe, N. and Tobinai, K., High prevalence of antibody to human herpesvirus-6 and decrease in titer with increase in age in Japan. *J Infect Dis* 1990. 161: 153-154.
- 145 Boutolleau, D., Duros, C., Bonnafous, P., Caiola, D., Karras, A., Castro, N. D., Ouachee, M., Narcy, P., Gueudin, M., Agut, H. and Gautheret-Dejean, A., Identification of human herpesvirus 6 variants A and B by primer-specific real-time PCR may help to revisit their respective role in pathology. *J Clin Virol* 2006. 35: 257-263.
- 146 Caserta, M. T., McDermott, M. P., Dewhurst, S., Schnabel, K., Carnahan, J. A., Gilbert, L., Lathan, G., Lofthus, G. K. and Hall, C. B., Human herpesvirus 6 (HHV6) DNA persistence and reactivation in healthy children. *J Pediatr* 2004. 145: 478-484.
- 147 Sassenscheidt, J., Rohayem, J., Illmer, T., Bandt, D., Detection of β -herpesviruses in allogeneic stem cell recipients by quantitative real-time PCR. *Journal of Virological Methods* 2006. 138: 40-48.
- 148 Kim, J. S., Lee, K. S., Park, J. H., Kim, M. Y. and Shin, W. S., Detection of human herpesvirus 6 variant A in peripheral blood mononuclear cells from multiple sclerosis patients. *Eur Neurol* 2000. 43: 170-173.
- 149 Cone, R. W., Huang, M. L., Hackman, R. C. and Corey, L., Coinfection with human herpesvirus 6 variants A and B in lung tissue. *J Clin Microbiol* 1996. 34: 877-881.
- 150 Ward, K. N., Leong, H. N., Thiruchelvam, A. D., Atkinson, C. E. and Clark, D. A., Human herpesvirus 6 DNA levels in cerebrospinal fluid due to primary infection differ from those due to chromosomal viral integration and have implications for diagnosis of encephalitis. *J Clin Microbiol* 2007. 45: 1298-1304.
- 151 Bates, M., Monze, M., Bima, H., Kapambwe, M., Clark, D., Kasolo, F. C. and Gompels, U. A., Predominant human herpesvirus 6 variant A infant infections in an HIV-1 endemic region of Sub-Saharan Africa. *J Med Virol* 2009. 81: 779-789.
- 152 Dzieciatkowski, T., Przybylski, M., Torosian, T., Tomaszewska, A. and Luczak, M., Prevalence of human herpesvirus 6 antibodies and DNA in allogeneic stem cell transplant patients: two-year single centre experience. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2008. 56: 201-206.
- 153 Imbert-Marcille, B. M., Tang, X. W., Lepelletier, D., Besse, B., Moreau, P., Billaudel, S. and Milpied, N., Human herpesvirus 6 infection after autologous or allogeneic stem cell transplantation: a single-center prospective longitudinal study of 92 patients. *Clin Infect Dis* 2000. 31: 881-886.
- 154 Wang, L. R., Dong, L. J., Zhang, M. J. and Lu, D. P., The impact of human herpesvirus 6B reactivation on early complications following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006. 12: 1031-1037.

- 155 Boeckh, M. and Nichols, W. G., The impact of cytomegalovirus serostatus of donor and recipient before hematopoietic stem cell transplantation in the era of antiviral prophylaxis and preemptive therapy. *Blood* 2004. 103: 2003-2008.
- 156 Miyoshi, H., Tanaka-Taya, K., Hara, J., Fujisaki, H., Matsuda, Y., Ohta, H., Osugi, Y., Okada, S. and Yamanishi, K., Inverse relationship between human herpesvirus-6 and -7 detection after allogeneic and autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001. 27: 1065-1070.
- 157 Schoppel, K., Schmidt, C., Einsele, H., Hebart, H. and Mach, M., Kinetics of the antibody response against human cytomegalovirus-specific proteins in allogeneic bone marrow transplant recipients. *J Infect Dis* 1998. 178: 1233-1243.
- 158 Munoz, I., Gutierrez, A., Gimeno, C., Farga, A., Alberola, J., Solano, C., Prosper, F., Garcia-Conde, J. and Navarro, D., Lack of association between the kinetics of human cytomegalovirus (HCMV) glycoprotein B (gB)-specific and neutralizing serum antibodies and development or recovery from HCMV active infection in patients undergoing allogeneic stem cell transplant. *J Med Virol* 2001. 65: 77-84.
- 159 Ludwig, B., Kraus, F. B., Kipp, M., Preiser, W., Schwerdtfeger, R., Doerr, H. W. and Buxbaum, S., Cytomegalovirus-specific CD4 T-cell and glycoprotein B specific antibody response in recipients of allogeneic stem cell transplantation. *J Clin Virol* 2006. 35: 160-166.
- 160 Ljungman, P., Lonnqvist, B., Gahrton, G., Ringden, O. and Wahren, B., Cytomegalovirus-specific lymphocyte proliferation and in vitro cytomegalovirus IgG synthesis for diagnosis of cytomegalovirus infections after bone marrow transplantation. *Blood* 1986. 68: 108-112.
- 161 Boland, G. J., Vlieger, A. M., Ververs, C. and De Gast, G. C., Evidence for transfer of cellular and humoral immunity to cytomegalovirus from donor to recipient in allogeneic bone marrow transplantation. *Clin Exp Immunol* 1992. 88: 506-511.
- 162 Reddy, S. and Manna, P., Quantitative detection and differentiation of human herpesvirus 6 subtypes in bone marrow transplant patients by using a single real-time polymerase chain reaction assay. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005. 11: 530-541.
- 163 Nitsche, A., Muller, C. W., Radonic, A., Landt, O., Ellerbrok, H., Pauli, G. and Siegert, W., Human herpesvirus 6A DNA Is detected frequently in plasma but rarely in peripheral blood leukocytes of patients after bone marrow transplantation. *J Infect Dis* 2001. 183: 130-133.
- 164 Volin, L., Lautenschlager, I., Juvonen, E., Nihtinen, A., Anttila, V. J. and Ruutu, T., Human herpesvirus 6 antigenaemia in allogeneic stem cell transplant recipients: impact on clinical course and association with other beta-herpesviruses. *Br J Haematol* 2004. 126: 690-696.

7. Danksagung:

Zum Abschluss meiner Arbeit möchte ich mich ganz besonders bei meinem Doktorvater Professor Dr. Enno Jacobs sowie Herrn Dr. Bandt für die Überlassung des interessanten Themas bedanken. Sie haben diese Arbeit mit ihren Ideen, ihrer Geduld und Erfahrung sowie vielen fruchtbaren Diskussionen immer wieder vorangetrieben und hatten stets ein offenes Ohr für alle anfallenden Probleme.

Ein besonderer Dank gilt auch den Initiatoren des Wachstumskerns „Bioresponse“ und im Besonderen Herrn Dr. Lehmann für seine interessanten und wichtigen Hinweise sowie auch allen anderen hier nicht genannten Mitarbeitern des mit dem Wachstumskern assoziierten Netzwerkes.

Bei der Jürgen-Manchot-Stiftung bedanke ich mich für das Doktorandenstipendium, wodurch eine vertiefte Bearbeitung verschiedener Fragestellungen ermöglicht wurde.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Anke Lindner für ihre praktische Unterstützung und der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Lindemann sowie der Calicigruppe von PD Dr. J. Rohayem für Ihre Diskussions- und Hilfsbereitschaft bedanken.

An dieser Stelle bedanke ich mich außerdem bei meinem Mann Hanno Voigt und meinem Sohn Leon für ihre unermüdliche Geduld während meiner Promotionszeit. Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, Schwiegereltern und Freunden, die durch die Betreuung von unserem Sohn Leon diese Arbeit ermöglicht haben.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich diese Dissertation selbstständig verfasst habe. Es wurden keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt. Diese Arbeit wurde angefertigt am Institut für Virologie der Medizinischen Fakultät der TU Dresden unter der wissenschaftlichen Betreuung von Prof. Dr. E. Jacobs. Diese Dissertation wurde weder in dieser noch in ähnlicher Form an einer anderen Stelle zum Zwecke eines Promotions- oder anderen Prüfungsverfahrens eingereicht. Es haben meinerseits keine vorherigen erfolglosen Promotionsversuche stattgefunden.

Dresden, den 21.12.2009

Andrea Thäder-Voigt

8. Thesen

1. Im Rahmen des BMBF-Projektes BioResponse und der nachfolgenden Stipendiatenförderung durch die Jürgen-Manchot-Stiftung wurde für den Mikroblot eine infektionsdiagnostische Applikation entwickelt und evaluiert. Die Mikroblottechnologie - ein an Mirowellplatten angepasstes und auf Streifentesttechnologie basierendes Multiparameterdiagnostiksystem - ermöglicht den simultanen Nachweis von bis zu 10 Antigen-spezifischen IgG-Antikörpern bei geringem Proben- und Reagenzienverbrauch.
2. Die entwickelten HCMV- und HHV6-IgG-Mikroblots sind für den serologischen Nachweis von HCMV- bzw. HHV6-Infektionen sowie HCMV- bzw. HHV6-Reaktivierungen geeignet.
3. Im Vergleich zu kommerziell erhältlichen serologischen Testsystemen (HHV6-IgG-IFT; Euroimmun, Lübeck, HCMV-IgG-ELISA; Dade Behring, Marburg, HCMV-IgG-recom Blot, Mikrogen, Neuried) weist der Mikroblot eine vergleichbare Sensitivität auf oder ist im Vergleich zum HHV6-IgG-ELISA (Panbio, Rüsselsheim) die empfindlichere Nachweismethode.
4. Die Spezifität des HHV6-IgG-Mikroblots ist mit den Spezifitäten der HHV6-Testsysteme (HHV6-IgG-IFT Euroimmun, Lübeck, HHV6-IgG-ELISA, Panbio, Rüsselsheim) vergleichbar. Der HCMV-IgG-Mikroblot wies im Vergleich zu HCMV-IgG-ELISA (Dade Behring, Marburg) und HCMV-IgG-recom Blot (Mikrogen, Neuried) eine Spezifität von 80% bzw. 83% auf.
5. Die Mikroblottechnologie wurde primär für die Testung von Plasmen und Seren etabliert. Der HCMV-IgG-Mikroblot ist auch in der Liquordiagnostik einsetzbar. Beim HHV6-IgG-Mikroblot konnte ein Einsatz in der Liquordiagnostik jedoch bis heute nicht gezeigt werden.
6. Der HHV6-Mikroblot ermöglicht eine serologische Unterscheidung zwischen monovalenten HHV6 A- und HHV6 B-Seren/ -Plasmen sowie den Nachweis von HHV6 A-/ B-polyvalenten Seren/ Plasmen.
7. Die serologische Beurteilung zeigte, dass über 80% der Erwachsenen IgG-Antikörper sowohl gegen HHV6 A-Antigene, als auch gegen HHV6 B-Antigene aufwiesen und daher vermutlich mit HHV6 A und HHV6 B infiziert sind. Die polyvalenten Seren der Erwachsenen reagierten häufiger und stärker mit den HHV6 B-Antigenen als mit den HHV6 A-Antigenen. Das könnte auf eine häufigere Re-Infektion bzw. Reaktivierung des HHV6 B-Subtypen hindeuten.

8. Die serologischen Ergebnisse weisen bei Kindern auf eine Primärinfektion innerhalb der ersten beiden Lebensjahre mit HHV6 B hin. Die Infektion mit HHV6 A erfolgt hingegen in einem späteren Lebensalter.

9. Die HHV6- bzw. HCMV-Antikörperverläufe der Patienten nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSZT) wiesen zwischen der positiven HHV6- bzw. HCMV-PCR und den HHV6- bzw. HCMV-Antikörperentwicklungen keine Zusammenhänge auf.

10. Einen Einfluss des HCMV-Serostatus des Transplantatspenders auf die IgG-Antikörperentwicklung des Empfängers nach der HSZT konnte gezeigt werden. In den ersten 180 Tagen nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation konnten überwiegend nur bei HCMV-positiven Patienten mit positiven HCMV-Transplantatspendern unabhängig von den nachgewiesenen HCMV-Reaktivierungen frühe IgG-Antikörperanstiege beobachtet werden. Diese frühen IgG-Antikörperanstiege sind vermutlich durch die mit dem Stammzelltransplantat übertragenen B-Gedächtniszellen oder Plasmazellen sowie seltener durch chemoradioresistente Plasmazellen verursacht und können zu einer frühen Immunrekonstitution beitragen.

11. Im Unterschied zu den kommerziell erhältlichen ELISA oder IFT ist mit dem Mikroblobot neben der Bestimmung des Antikörpertiters auch eine differenzierte Auswertung der Antigen-spezifischen IgG-Antikörperantworten möglich. So konnte bei sieben von 22 Patienten trotz Abfall des HCMV-Antikörpertiters bzw. stabilem HCMV-Antikörpertiter eine Zunahme von einzelnen HCMV Antigen-spezifischen IgG-Antikörpern nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation beobachtet werden. Dies könnte serologisch auf eine HCMV-Reaktivierung hinweisen.

12. Der gezeigte Wechsel der HCMV Antigen-spezifischen IgG-Antikörpermuster 6 Monate nach der HSZT bei drei von zehn Patienten mit negativen HCMV-Transplantatspendern verweist auf die Bildung von neuen IgG-Antikörper sezernierenden B-Lymphozyten und einen Wechsel der B-Lymphozytenpopulation vom Empfänger zum Spender. Der Wechsel der B-Lymphozytenpopulation vom Empfänger zum Spender ist für die Patienten ein wichtiger Schritt für die Rekonstitution der B-Lymphozyten.

13. Eine Unterscheidung der HHV6-Subtypen auf serologischer Basis nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation wurde neu etabliert. Die HHV6 A und HHV6 B Antigen-spezifischen IgG-Antikörperantworten nach HSZT lassen vermuten, dass der HHV6 B-Subtyp eher und häufiger nach der HSZT reaktiviert, als der HHV6 A-Subtyp.