UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta
Katedra antropologie a genetiky člověka

Studijní program Biologie
Studijní obor Antropologie a genetika člověka

Bc. Alena Hrdličková

Výskyt a biologická souvislost chromozomálně integrovaného šestého lidského herpesviru v české populaci

Occurrence of chromosomally integrated human herpesvirus sixth in the Czech population and its biological consequences

Školitel: MUDr. Petr Hubáček Ph.D.

Praha 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne: 15.8.2013 Alena Hrdličková

Vedoucím diplomové práce byl MUDr. Petr Hubáček Ph.D.

Poděkování

Především bych ráda poděkovala MUDr. Petru Hubáčkovi, Ph.D. za skvělé vedení mé práce, trpělivost a ochotu kdykoli poradit a pomoci.

Dále bych chtěla poděkovat Petře Dušátkové, Ph.D. a celému kolektivu Laboratoře molekulární genetiky za podporu a vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Své rodině děkuji za podporu především během kompletování diplomové práce.

Diplomová práce vznikla v rámci projektu podpořeného Interní grantovou agenturou Ministerstva zdravotnictví ČR (NS9907).

Obsah

Abstrakt 7
Abstract 8
1 Úvod 9
2 Cíle diplomové práce 10
3 Literární rešerše 11
3.1 Herpesviry 11
3.1.1 Původ, taxonomie lidských herpesvirů a jejich běžné projevy 11
3.1.2 Projevy herpetických virů u imunokompromitovaných 14
3.2 Klinické projevy HHV-6 15
3.2.1 Primoinfekce 15
3.2.2 Projevy u imunokompromitovaných pacientů 16
3.2.3 Diagnostika virové nálože 16
3.3 Vstup do hostitelské buňky 18
3.4 Genom HHV-6A a B 18
3.5 Životní cyklus HHV-6 21
3.5.1 Replikace 21
3.5.2 Latentní infekce 23
3.6 Buněčné interakce HHV-6 24
3.6.1 Imunomodulace 24
3.6.2 Transaktivační aktivita 26
3.6.3 Nastavení infikované buňky k apoptóze 27
3.7 Chromozomálně integrovaný HHV-6 (Ci-HHV-6) 28
3.7.1 Diagnostika Ci-HHV-6 29
3.7.2 Lidské telomerické oblasti v souvislosti s Ci-HHV-6 29
3.7.3 Další lidské herpesviry integrující se do lidského genomu 30
3.7.4 Mechanismus chromozomální integrace MDV 31
3.7.5 Mechanismus chromozomální integrace HHV-6 31
3.7.6 Možné dopady Ci-HHV-6 na lidský organizmus 32
4 Laboratorní přístroje a pomůcky 34
4.1 Laboratorní přístroje a spotřební materiál 34
4.2 Spotřební materiál 34

5 Metody 36
5.1 Kvantifikace virové nálože ve vzorcích a identifikace Ci-HHV-6 36
5.1.1 Izolace DNA z plné krve 39
5.1.2 Izolace DNA z nehtů 39
5.1.3 Kvantifikace RQ-PCR 40
5.1.4 Hodnocení kalibrační křivky 42
5.1.5 Molekulární klonování 42
5.2 Hybridizace a značení FISH 44
5.2.1 Příprava nosičové DNA pro výrobu sondy 44
5.2.2 Příprava sklíček s metafazickými jádry 45
5.2.3 Hybridizace 45
5.3 Transkripce Ci-HHV-6 46
5.3.1 Izolace mononukleárních buněk hustotním gradientem 47
5.3.2 Izolace RNA z mononukleárních leukocytů 47
5.3.3 Ošetření RNA DNázou a ověření její kvality 48
5.3.4 Přepis RNA do cDNA 48
5.3.5 Ověření cDNA genem pro B2M, BG, ABL, GAPDH 50
5.3.6 Kvalitativní PCR pro vybrané virové geny 51
6 Charakteristika pacientů a kontrolního souboru 54
6.1 Pacienti 54
6.2 Kontrolní skupina 55
6.3 Statistické zhodnocení výsledků 55
7 Výsledky 56
7.1 Srovnání četnosti výskytu Ci-HHV6 ve zdravé populaci a u pacientů s maligním onemocněním 56
7.2 Rodinné studie 57
7.3 Virová transkripce Ci-HHV-6 61
8 Diskuze 63
8.1 Frekvence výskytu Ci-HHV-6A a B, zdraví vs nemocní 63
8.2 Integrace HHV-6 do stejných míst v lidském genomu 65
8.3 Transkripce virových proteinů Ci-HHV-6 66
9 Závěr 67
10 Přílohy 68

10.1 Příloha 1 – Článek 1 69
10.2 Příloha 2 – Článek 2 73
10.3 Příloha 3 – Článek 3 82
10.4 Příloha 4 – Poster 88
10.5 Příloha 5 – Sekvence primerů pro reverzní transkripci 89
10.6 Příloha 6 – Soupis onemocnění 91
10.7 Příloha 7 – Informovaný souhlas 93
10.8 Příloha 8 – Návody 94
10.8.1 QIAamp DNA Blood Mini Kit 94
10.8.2 QIAamp DNA Micro Kit 95
10.8.3 Plasmid mini kit 96
10.8.4 Plasmid maxi kit 97
10.8.5 Lympho grow 98
11 Seznam zkratek 99
12 Seznam použité literatury 101

Abstrakt

Šestý lidský herpesvirus (HHV-6) je komplexem dvou blízce příbuzných DNA virů: HHV-6A a HHV-6B. Primoinfekce probíhá už v raném dětském věku ať již ve formě šesté exantémové nemoci, nebo asymptomaticky. Oba viry HHV-6 jsou schopny se rekombinačními mechanismy integrovat do lidského genomu. Tato vlastnost je vzhledem k ostatním lidským herpetickým virům jedinečná. Tato diplomová práce se věnuje studiu Ci-HHV-6 ve zdravé populaci a ve skupině s maligním onemocněním. Testovali jsme 812 pacientů s maligním onemocněním a 420 osob ze zdravé populace. Přítomnost HHV-6 DNA jsme určili pomocí real-time PCR, lokalizaci integrace viru jsme pak detekovali pomocí fluorescenční hybridizace *in situ* (FISH). Srovnávací studií jsme nezjistili statisticky významný rozdíl ve frekvenci Ci-HHV-6 u pacientů s maligním onemocněním (1,11%) a zdravé kontrolní skupiny (0,95%) (P=0,8). U potvrzených integrací jsme dále prokázali dědičnost tohoto fenoménu u rodinných příslušníků. Pomocí FISH jsme lokalizovali Ci-HHV-6 do telomerických oblastí chromozomů 2 a 18. Otestovali jsme také tvorbu virových proteinů u nosičů Ci-HHV-6 pomocí detekce mRNA. V rámci této práce jsme provedli první epidemiologickou studii výskytu Ci-HHV-6 v populaci zdravých dárců v České republice a zavedli jsme nové metody k lepší charakteristice tohoto fenoménu.

Abstract

Human Herpes Virus 6 (HHV-6) consists of two closely related DNA viruses: HHV-6A and HHV-6B. The primoinfection proceeds at an early childhood usually as sixth exanthem disease or without any clinical symptoms. Both HHV-6 viruses are able to integrate to human genome using recombinant mechanisms which is unique compared to other human herpesviruses. The aim of the thesis is to study Ci-HHV-6 in a group of patients with malign disease and in the healthy population. We analysed 812 patients with malign disease and 420 healthy subjects from general population. The Ci-HHV-6 was assessed by real-time PCR, the specific localization of Ci-HHV-6 was determined using fluorescent *in situ* hybridization (FISH). Using comparative study, we did not identify significant difference between frequency of Ci-HHV-6 in patients with malign disease (1.11%) and healthy subjects (0.95%) (P-value 0.8). Consequently, we proved the heritability of Ci-HHV-6 in affected families. We determined the localization of Ci-HHV-6 to telomeric regions of chromosomes 2 and 18. We studied the production of viral proteins in the subjects with Ci-HHV-6. In this work, we conducted the first epidemiological study of Ci-HHV-6 in the Czech Republic. We also introduced novel methods which contribute to better characterization of this phenomenom.

1 Úvod

Herpesviry jsou velké DNA viry, které zdravým jedincům zpravidla nezpůsobují závažné komplikace a následně přetrvávají ve formě latentní infekce v organismu, aniž by mu významně škodily. Vzhledem k interakcím, ke kterým dochází mezi virem a hostitelskou buňkou během jeho životního cyklu jsou herpesviry často asociovány i s dalšími onemocněními. U šestého lidského herpesviru (HHV-6) jsou popsány možné asociace působení viru např. u Hodgkinova lymfomu (HL) a T-buněčné leukémie. I kvůli vysoké promořenosti HHV-6 v běžné populaci je potřeba osvětlit řadu nejasností v etiologii s ním asociovaných stavů.

V případě chromozomálně integrovaného šestého lidského herpesviru (Ci-HHV-6) vyvstává další stěžejní otázka: můžeme tuto virovou interakci s hostitelskými organismem považovat jen ze slepou cestu v hledání ideálního soužití viru s hostitelem nebo se jedná o novou formu latence s přepisovanými virovými proteiny a možnou reaktivací viru? Faktem je, že samotná virová integrace je zásahem do molekulárních struktur buněčných pochodů a případně do buněčných drah. Je možné, že přežití buněk s takto narušenou chromozomální strukturou může mít na organismus negativní dopad.

V naší práci jsme se proto zaměřili jednak na prozkoumání asociací Ci-HHV-6 s maligními onemocněními v naší populaci pomocí srovnávací studie se zdravými dárci, prostřednictvím rodinných studií jsme potvrdili již dříve prokázanou dědičnost u Ci-HHV-6 a v neposlední řadě jsme testovali přepis genů Ci-HHV-6 do mRNA. Přestože je možné, že integrovaný virus přepisuje některé své proteiny a dokonce není ani vyloučená jeho reaktivace, u pacientů po transplantaci hematopoetických kmenových buněk (HSCT) nepůsobí žádné problémy. Protože se u imunosuprimovaných pacientů v případě propuknutí betaherpesvirové lytické infekce podávají virostatika, která mají množství nežádoucích účinků, je u těchto pacientů nutné správně identifikovat zda se jedná o virus reaktivovaný z běžné latence a nebo zda se jedná o virus integrovaný. U pacientů s prokázanou integrací se dnes virostatická léčba nepodává.

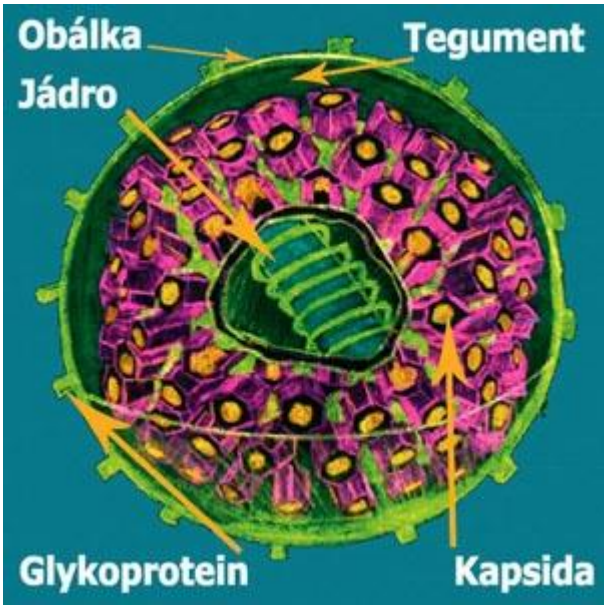
2 Cíle diplomové práce

- Porovnat incidenci chromozomálně integrovaného šestého lidského herpesviru u pacientů s maligním onemocněním a u zdravých kontrol bez maligních onemocnění pro ověření možného působení viru na hostitele a statisticky zhodnotit frekvenci výskytu Ci-HHV-6 ve skupině s maligním onemocněním a ve skupině zdravých dobrovolných dárců. U zachycených Ci-HHV-6 provést rodinnou studii a potvrdit či vyvrátit hypotézu o klasické mendelovské dědičnosti.
- Zavést metodiky pro rozlišení HHV-6 A a B metodou kvantitativní polymerázové řetězové reakce (PCR). V rámci nové mezinárodní virové taxonomie (International Commitee on Taxonomy of Viruses – ICTV; http://ictvonline.org/index.asp, 1.8.2013) se HHV-6 rozdělil na dva samostatné druhy (HHV-6A a HHV-6B) a proto byl jeden z našich cílů zavést novou metodiku plně kompatibilní k již zavedeným metodám v Laboratoři molekulární genetiky při Ústavu lékařské mikrobiologie 2. LFUK a FNM (ÚLM).
- Zavést metodiku pro identifikaci místa integrace HHV-6 do lidského chromozomu fluorescenční hybridizací *in situ* (FISH).
- Získat materiál vhodný pro otestování možného přepisu virových transkriptů integrovaného viru.

3 Literární rešerše

3.1 Herpesviry

Herpesviridae je početná rodina virů asi o 100 členech, adaptovaných na různé živočišné druhy. Všechny viry čeledi herpesviridae mají genom velikosti 125-240 kb tvořený dvojvláknovou DNA, která kóduje přibližně 100 genů. Lidské herpesviry jsou DNA viry s partikulemi střední velikosti (180 až 200 nm). Díky silnější tegumentové vrstvě lze od ostatních virů v této čeledi morfologicky odlišit HHV6. Celý virion má průměr přibližně 200 nm (Roizman and Pellett 2001).



Obr. 1 Virová partikule *(http://lupidon.info/Virologie.htm 1.8.2013)*

Herpetické viry tvoří tři segmenty. Jádro nesoucí DNA je chráněno kapsidou s icosahedrální symetrií. Kapsida je obklopena tegumentem nesoucím proteiny nezbytné k replikaci. Obálka chrání virus v extracelulárním prostoru, do ní jsou zanořeny glykoproteinové komplexy zprostředkovávající vazbu s hostitelskou buňkou.

3.1.1 Původ, taxonomie lidských herpesvirů a jejich běžné projevy

Herpesviry jsou dobře přizpůsobeny svému imunokompetentnímu hostiteli a tak vzhledem k tomu, že fatální infekce je pro přežití viru nežádoucí, dochází k takovéto infekci jen vzácně. Jedna z možných hypotéz o původu herpesvirů říká, že existovaly již před savčí radiací (Kamble, Clark aj. 2007), což ukazuje na dlouhou koexistenci a koevoluci herpesvirů a jejich hostitelů. Díky tomu získaly herpesviry během svého vývoje mnoho

genů svých buněčných hostitelů. Tato strategie jim pomáhá modifikovat chování hostitelského organismu tak, aby virus mohl v hostiteli latentně setrvat. Životní cyklus herpetických virů může vést jak k infekci lytické, tak k infekci latentní. Zjednodušeně se dá říct, že při lytické infekci dochází k replikaci viru a smrti hostitelské buňky a při ustanovení latentní infekce virus dlouhodobě perzistuje v hostitelském organismu a replikuje se případně jen v malé míře tak aby neohrozil svého hostitele.

Až dosud je známých 9 lidských herpesvirů, které se podle morfologické a genetické příbuznosti dělí do několika taxonů (Arbuckle, Medveczky aj. 2010).

Podčeleď:**Alphaherpesvirinae**

Viry v této podčeledi využívají variabilních hostitelských buněk k relativně krátkému reprodukčnímu cyklu. Rychle a dobře se množí *in vitro* v buněčné kultuře a vytváří latentní infekce, především, nikoli však výhradně v senzorických nervových gangliích (Roizman and Pellett 2001).

Podčeleď: **Betaherpesvirinae**

Naopak viry této skupiny mají omezený výběr hostitelských buněk, relativně dlouhý reprodukční cyklus a *in vitro* v buněčné kultuře se množí jen pomalu. Infikované buňky jsou často zvětšené a tak snadno odhalitelné. V latentní formě viry přetrvávají v sekrečních žlázách, ledvinách a dalších tkáních (Roizman and Pellett 2001).

Podčeleď: **Gammaherpesvirinae**

Spektrum hostitelských buněk pro experimenty *in vitro*, je omezené, všechny členy této podčeledi lze kultivovat v lymfoblastoidních buňkách. Lytickou infekci mohou tyto viry způsobit v některých typech epiteliálních a fibroblastických buňkách. Viry v této skupině jsou obvykle specifické pro T nebo B lymfocyty. V latentní formě virus často přežívá v lymfatických tkáních (Roizman and Pellett 2001).

Stručný přehled lidských herpesvirů a jejich běžných projevů uvádím v tabulce 1.

Tab. 1 Přehled lidských herpesvirů

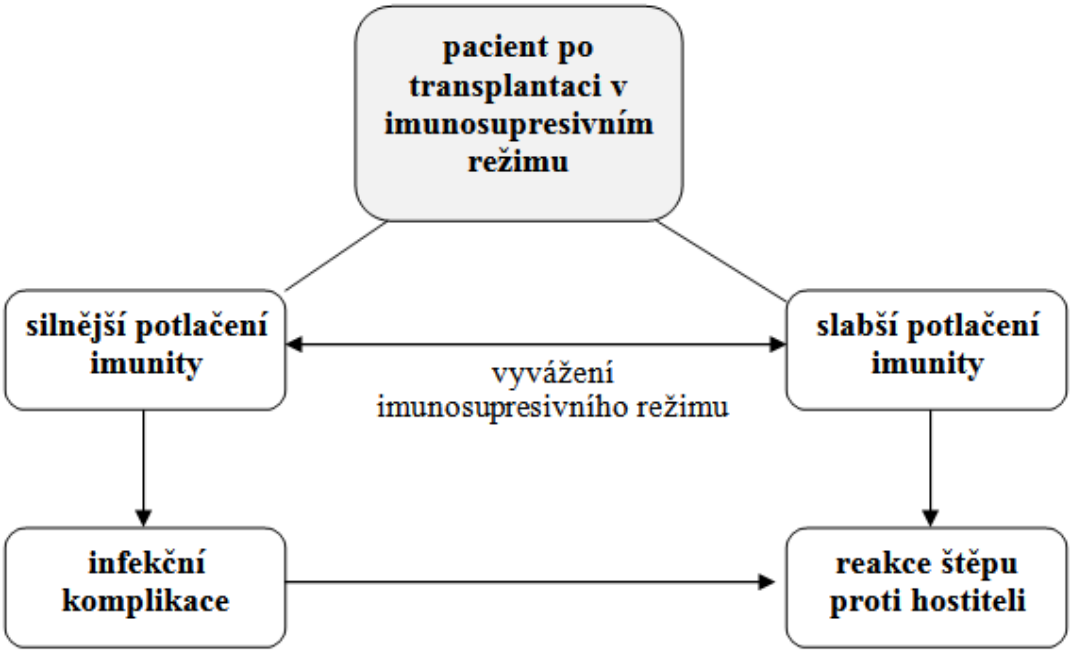
Rod	Systematické jméno	Systematická zkratka	Běžné jméno	Běžná zkratka	Symptomy primoinfekce
Podčeleď: **Alphaherpesvirinae**					
Simplexvirus	Lidský herpesvirus 1	HHV-1	Herpes simplex 1	HSV-1	Asymptomaticky/zánětlivé herpetické výsevy dásně a sliznice dutiny ústní, případně genitálu
Simplexvirus	Lidský herpesvirus 2	HHV-2	Herpes simplex 2	HSV-2	Herpetické výsevy v oblasti genitálu, případně v oblasti dásně a sliznice dutiny ústní
Varicellovirus	Lidský herpesvirus 3	HHV-3	Varicella zoster	VZV	plané neštovice a pásový opar
Podčeleď: **Betaherpesvirinae**					
Cytomegalovirus	Lidský herpesvirus 5	HHV-5	Cytomegalovirus	CMV, HCMV	Asymptomaticky/může se objevit horečka s lymfocytózou, mononukleóza-like syndrom
Roseolovirus	Lidský herpesvirus 6A	HHV-6A	-	HHV-6A	není znám patogenní účinek na člověka
Roseolovirus	Lidský herpesvirus 6B	HHV-6B	-	HHV-6B	šestá exantémová nemoc
Roseolovirus	Lidský herpesvirus 7	HHV-7	-	HHV-7	Asymptomaticky, případně jako šestá exantémová nemoc
Podčeleď: **Gammaherpesvirinae**					
Lymphocryptovirus	Lidský herpesvirus 4	HHV-4	Virus Epstein-Baarové	EBV	infekční mononukleóza
Rhadinovirus	Lidský herpesvirus 8	HHV-8	Kaposi´s Sarcoma associated Herpesvirus	KSHV	Asymptomaticky/(popsaný v souvislosti se syndromem získaného selhání imunity)

Upraveno podle: Bednář et al., Lékařská mikrobiologie 1996, Cann, Principles of Molecular Virology 2001

Pozn.: Názvosloví u herpetických virů není u odborné veřejnosti sjednoceno. Pro úplnost uvádíme jak běžné, historicky užívané a rozšířené jméno (a zkratku z něj vyplívající), tak systematické jméno (a zkratku) kterou jednotlivým virům taxonomicky přiřadila ICTV (International Commitee for Taxonomy of Viruses). Tato organizace se v roce 2012 rovněž usnesla, že vzhledem k různorodému biologickému projevu u dvou typů viru HHV6 budou v dalším vydání mezinárodní virové nomenklatury uznány za dva samostatné virové druhy.

3.1.2 Projevy herpetických virů u imunokompromitovaných

Zatímco u zdravých jedinců má infekce většinou klidný, někdy i bezpříznakový průběh, problém nastává u imunokompromitovaných pacientů. Speciální péče se pak věnuje pacientům před a po alogenní transplantaci hematopoetických buněk. V ÚLM mimo jiné diagnostikují virové infekce u těchto pacientů. Vedle bakteriálních a mykotických komplikací se v průběhu léčby objevují také problémy způsobené virovými infekcemi. Objevují se v různé době po alogenní HSCT, nejčastěji ale v prvním půlroce po transplantaci. Tehdy se v organismu objevují buňky, ve kterých se množí především betaherpesviry a gamaherpesviry (Aalto, Juvonen aj. 2003). Přirozená protivirová imunita vlivem imunosuprese ještě nemohla být plně obnovena a tak dochází k různým komplikacím, které mohou skončit fatálně. Do léčebného protokolu je sice zapojena profylaxe acyklovirem proti alfaherpesvirům, ale proti ostatním herpesvirům zůstává organismus bezbranný. V rámci komplexnosti léčby pak musí lékaři nastavit takové dávkování léků, aby zachovali rovnováhu mezi možnými komplikacemi způsobenými cizími patogeny a zároveň šetrně utlumili imunitní reakci tak, aby nepropukla reakce štěpu proti hostiteli (Bjorklund, Aschan aj. 2007; da Fonseca and Hong 2008; Levine, Paczesny aj. 2008). Shrnutí možných komplikací je znázorněno v obrázku 2.



Obr. 2 Vztah komplikací u alogenní HSCT

3.2 Klinické projevy HHV-6

HHV-6 byl poprvé popsán v roce 1986 u pacientů s lymfoproliferativním onemocněním (Salahuddin, Ablashi aj. 1986). V roce 1993 Ablashi ve své práci popsal 2 subtypy tohoto viru. Genom obou virů se z velké části shoduje (viz níže kapitola 3.4.), ale klinické projevy při primoinfekci jsou různé (De Bolle, Naesens aj. 2005).

3.2.1 Primoinfekce

U varianty A dosud nebyl prokázán patologický projev, je to tzv. orphan virus. Pro vliv na lidský organismus může svědčit fakt, že byl prokázán častěji u pacientů s demyelinizačními neurologickými onemocněními (jako je např. roztroušená skleróza)(Virtanen, Farkkila aj. 2007).

U HHV-6B se počáteční infekce projeví horečnatým onemocněním, kdy se teploty blíží 40°C. Horečka může trvat 3-7 dní a pak rychle skončí. U některých nakažených dětí se může objevit exantema subitum, známý také jako roseola infantum (Ward 2005). Vyrážka přetrvává po dobu 1-2 dnů, je nejčastěji omezena na záda, trup a krk, ale může se objevit v obličeji, na pažích a nohou. Vyrážka obvykle nepůsobí žádné potíže a není prostředkem přenosu (Stoeckle 2000). Asi u 10% nemocných dětí se v počáteční fázi nemoci mohou objevit febrilní křeče (De Bolle, Naesens aj. 2005). Infekce také může zapříčinit tzv. mononukleóza-like syndrom (Ward 2005). Po proběhnutí primoinfekce přechází virus do latentního stadia, které je bezpříznakové. Mírné virové replikace následně pokračují v epiteliálních buňkách slinných žláz a přítomnost viru ve slinách pak vede k možnému způsobu přenosu viru (Di Luca, Mirandola aj. 1996). K první HHV-6 infekci obvykle dochází během prvních 6-15 měsíců života. Nejčastěji je výskyt infekce pozorován u dětí kolem 6-9 měsíce věku, tedy často poté co dítě přestávají chránit mateřské protilátky (Enders, Biber aj. 1990). Při studii prevalence HHV-6 u těhotných žen se ukázalo, že virus se během těhotenství často reaktivuje (Dahl, Thorburn aj. 2000). Transplacentární přenos z matky na dítě je možný, ale je převážně spojen s Ci-HHV-6 detekovaným jak u matky tak u dítěte (Hall, Caserta aj. 2010). Další možnost jak může dojít k přenosu HHV-6, je během transplantace, z dárce na příjemce, ale ten může být rovněž asociován s Ci-HHV-6 (Clark, Nacheva aj. 2006; Kamble, Clark aj. 2007; Hubacek, Virgili aj. 2009).

Seroprevalence, tedy přítomnost protilátek proti HHV-6, se liší v závislosti na citlivosti sérologických testů a vzhledem k příbuznosti HHV-6 a HHV-7 může dojít ke zkřížené

reakci protilátek na antigen v imunofluorescenčním testu. Celkově se ale uvádí seroprevalence u více než 95 % obyvatelstva (De Bolle, Naesens aj. 2005).

3.2.2 Projevy u imunokompromitovaných pacientů

Přestože HHV-6 infekce nevykazuje žádné konkrétní symptomy, reaktivace nebo primoinfekce u pacientů pozitivních na virus lidské imunitní nedostatečnosti (HIV) může přispět ke zhoršení jejich stavu (Arbuckle, Medveczky aj.2010). Pacienti u kterých propukl syndrom získaného selhání imunity (AIDS) můžou trpět retinitidou oční sítnice způsobenou superinfekcí CMV a HHV-6 (Fillet, Reux aj. 1996).

Další skupiny pacientů, u kterých se sleduje virová nálož HHV-6, jsou pacienti léčení pro hematoonkologická onemocnění a pacienti po transplantaci. Typický je profil nástupu herpesvirové reaktivace po transplantaci. Nejprve se reaktivuje HHV-6 (medián 20 dní od transplantace), poté je následován reaktivací HHV-7 (26 dní) a následně dochází k reaktivaci CMV (36 dní) (Griffiths, Ait-Khaled aj. 1999).

Při léčbě pacientů ohrožených herpetickými infekcemi se užívají purinové analogy: aciklovir, ganciklovir, valganciklovir, cidofovir, a foscarnet které účinně inhibují virovou polymerázu. Mezi významné nežádoucí projevy ganciklovir a valganciklovir patří myelosupresivní účinky. U forcarnetu byla zaznamenána významná nefrotoxicita (Wagstaff and Bryson 1994; Wagstaff, Faulds aj. 1994; McGavin and Goa 2001; Snoeck and De Clercq 2002). Komplexní léčba pacientů mimo jiné snižuje proliferaci T-lymfocytů a tím umožňuje buněčným parazitům, jako jsou herpetické viry, rozvinout lytickou infekci. U těchto pacientů je HHV-6 popisován jako příčina horeček nejasné etiologie, pozdějšího přihojování krevních destiček, ale také hepatitid, pneumonií, encefalitid (obdobně jako CMV) (Ward 2005). Vzhledem k vysoké promořenosti HHV-6 v populaci dochází k reaktivaci po transplantaci kostní dřeně poměrně často - uvádí se 40 - 50 % (Yoshikawa, Suga aj. 1991; Yoshikawa, Asano aj. 2002).

3.2.3 Diagnostika virové nálože

První a také nejstarší možností detekce HHV-6 je izolace viru z krve a jeho průkaz v kultuře imunofluorescenčně značenými protilátkami. Sérologickými metodami nelze vždy přesvědčivě identifikovat aktivní infekci a proto se v případě imunosuprimovaných pacientů používá jen jako doplňková (např. vyšetření titrů protilátek před transplantací, díky kterému se zamezí přenosu viru z dárcovských buněk). Dynamika protilátkové

odpovědi určuje pořadí sekretovaných imonoglobulínů (Ig). Při počáteční imunitní odpovědi se tvoří specifické protilátky během 4-8 dní po nákaze. První protilátky jsou IgM a po nich se objevují IgG protilátky, které přetrvávají v organismu po delší dobu. Dobře rozlišitelná je pak primární infekce – v těle jsou jen IgM protilátky od reaktivace, kdy testy odhalí protilátky třídy IgM i IgG. Oba typy protilátek pak setrvávají v těle po celý zbytek života přičemž IgG ve větší míře (Belshe 1994).

V současné době se u pacientů s podezřením na HHV-6, i obecně virovou infekci, provádí detekce virových nukleových kyselin pomocí PCR a to zejména kvantitativního (RQ)-PCR. Dosud nebyla zvolena jasná celosvětová strategie pro interpretaci výsledků a tak se v literatuře můžeme setkat se různými přístupy ve vyjádření výsledků i testovaných materiálů. Jde o detekci z plazmy či z plné krve (Bordon, Bravo aj. 2008). V nebuněčné plazmě se nenachází latentně nakažené lymfocyty, materiál je tudíž vhodný pro detekci virémie, tedy uvolněných infekčních partikulí v krevním řečišti. V krvi se provádí detekce kompletní virové nálože včetně latentně infikovaných buněk. V případě stanovení virové nálože z plné krve neexistují obecně uznávané standardy pro hranici latentní infekce. Singh a kolektiv se pokusili stanovit hladinu virové latence na 10 genomů HHV6/1 000 000 buněk (Singh 2000). Vzhledem k již zaběhnutým esejím a složité interpretaci výsledků ale různé laboratoře a centra stále mají různé hranice pro nasazení terapie herpesvirových reaktivací, avšak obecně platí, že v případě reaktivace dochází k exponenciálnímu vzestupu kvantity virové DNA v periferní krvi (Hubacek, Hrdlickova aj. 2009).

Další možností je detekce aktivní infekce provedením reverzně transkriptázového PCR (RT)-PCR z izolovaných buněk periferní krve (PBMC). Touto metodou mohou být detekovány virové proteiny jako důkaz probíhající aktivní infekce. Nevýhodou oproti výše uvedeným je značná náročnost na provedení, nemožnost zcela přesného opakování a vysoké nároky na přístrojové vybavení.

V Laboratoři molekulární genetiky při ÚLM v Motole, mně bylo umožněno, vedle povinností vyplývajících z rutinního vyšetření, asistovat při výzkumu HHV-6 v detekci RQ-PCR převážně z plné krve. Výsledky jsou normalizovány na 10000 lidských genomických ekvivalentů pomocí kvantifikace albuminového genu (Pongers-Willemse, Verhagen aj. 1998) a jsou interpretovány jako normalizované virové kopie (NVCs) (Hubacek, Virgili aj. 2009).

3.3 Vstup do hostitelské buňky

Virus se naváže na buněčný receptor prostřednictvím vazebného glykoproteinu. Ten se skládá z několika podjednotek tvořících komplex gH/gL/gQ1/gQ2 (kódované geny U48, U82, U100) a gB (gen U39). Samotná vazba na receptor zřejmě probíhá díky podjednotce gH (Mori, Tanaka-Taya aj. 2009). Podjednotka gB nebyla nalezena v buněčné membráně ani v intracelulárním prostoru a předpokládá se, že je uvolněna do extracelulárního prostoru při navázání virové partikule na buněčný receptor. Působí zřejmě jako chemoatraktant ke zprostředkování vazby (Tanaka, Suenaga aj. 2013). Přestože dosud nebyly objasněny všechny vazebné interakce proteinu, jako receptor zprostředkovávající vstup HHV-6 do buňky byla odhalena molekula CD46 (Santoro, Kennedy aj. 1999). Nachází se na různých buňkách lidského organismu a v těle funguje jako kofaktor při inaktivaci C3b a C4b složek komplementu kofaktoru I. CD46 slouží jako ochrana před poškozením vlastních buněk komplementem (Riley-Vargas, Gill aj. 2004). Z nejnovějších výzkumů vyplívá, že pro HHV-6B může jako vstupní receptor sloužit CD134 také známý jako OX40. Tato molekula patří mezi TNF receptory a vzhledem ke své schopnosti zvýšit přežití CD4+ buněk má rozhodující roli v udržování imunitní odpovědi v prvních dnech po infekci, dokud nedojde cytokinovou signalizací ke spuštění paměťové odpovědi (Tang, Serada aj. 2013). Faktorem ovlivňujícím různý buněčný tropismum obou virů může být různý přepis glykoproteinového komplexu, kódovaný v oblasti U97-U100. Exon HN-3 spouštějící transkripci komplexu byl nalezen pouze u HHV-6B (Isegawa, Mukai aj. 1999). Přestože je HHV6 převážně lymfotropní, může infikovat *in vitro* i další buňky jako jsou monocyty/makrofágy, NK (Natural killer) buňky, fibroblasty, astrocyty, oligodendroglie, mikroglie, buněčné linie jaterních buněk, epiteliální a endoteliální buňky. V lidském organismu jsou popsány infekce mozkové tkáně, jater, tonsil, slinných žláz, endotelií a kostní dřeně (De Bolle, Naesens aj. 2005).

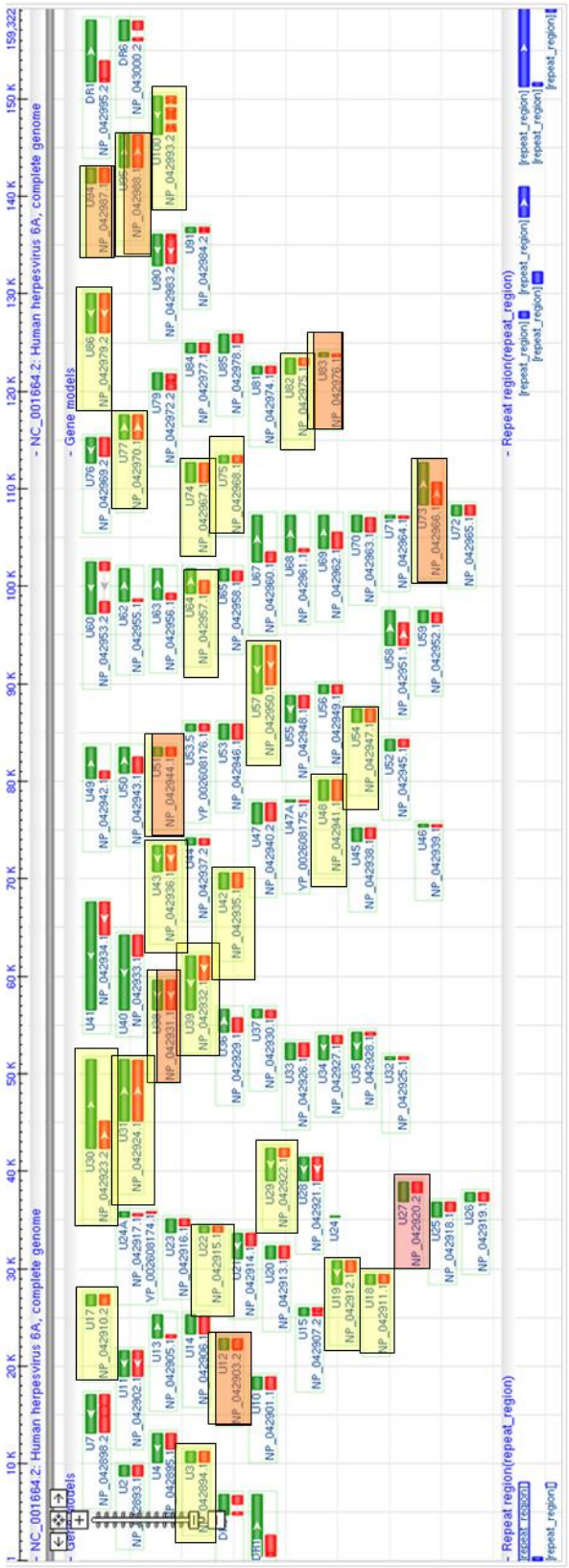
3.4 Genom HHV-6A a B

Po vstupu do jádra se dostává ke slovu virový genom. HHV-6 má dsDNA genom o velikosti 160-162 kb. Z toho 143-145 kb připadá na unikátní oblasti (U) pro geny U1-U100 s vloženými R1-R3 středovými repeticemi a 8-9 kb pro konečné sekvence (DR). Oblasti nazývané DR1-DR7 v sobě zahrnují sbalovací signál a v terminálních oblastech genomu se nacházejí opakující se sekvence charakteristické pro lidské telomery (Obr. 3) (Thomson, Dewhurst aj. 1994).

Geny společné pro betaherpesviry patří do rodiny US22 a u jednotlivých zástupců podčeledi jsou tyto geny prakticky totožné. Jiné geny jsou ale typické jen pro HHV-6 (např. U83, U94), funkce proteinů těchto genů je vysvětlena níže. Unikátní sekvence i oblasti repetic HHV-6B obsahují dohromady 119 otevřených čtecích rámců (ORF) tvořících 97 genů. HHV-6A a B se liší v přepisu 9 ORF. Genom obou virů se téměř shoduje - v centrální části se uvádí shoda 98 %, oblast IE-A (zahrnující v sobě geny U86 - U95 vyjma U94) pro přepis IE1a IE2 proteinů vykazuje největší rozdíly mezi HHV-6A a HHV-6B. Celkově se uvádí sekvenční shoda obou virů okolo 90 %. Genové oblasti kódující strukturální proteiny a enzymy potřebné pro metabolismus a replikaci virové DNA je zachován pro všechny herpesviry. Počátek replikace (oriLyt) a štěpné místo při replikaci (pac) se nachází na různých místech obou virů (De Bolle, Naesens aj. 2005).

Transkripce oblastí IE-A může probíhat z různých promotorů v závislosti na stádiu infekce (Schiewe, Neipel aj. 1994). U obou variant virů se v oblasti středových repetic R3 nacházejí vazebná místa pro buněčné transkripční faktory, především NF-kappaB. U HHV-6B bylo prokázáno, že interakcí s NF-kappaB dojde k zesílení transkripce genu U95 (homolog HCMV genu IE2). U HHV-6A je možné, že přepis IE proteinů je řízen právě z této oblasti (Takemoto, Shimamoto aj. 2001).

Proteiny přepisované z IE-B oblasti (zahrnující geny U16 - U19) patří mezi členy super rodiny US22 a vykazují značnou podobnost genům UL36 a UL38 CMV, které kódují transaktivační činitele zvyšující virovou a buněčnou transkripci (Colberg-Poley, Santomenna aj. 1992).



V horní části obrázku je reálné měřítko (Kb), v prostřední části geny a proteiny, v dolní části jsou znázorněny opakující se sekvence

Geny pro námi transkribované proteiny

Geny pro proteiny o nichž se píše v textu

Obr. 3 Genom HHV-6A

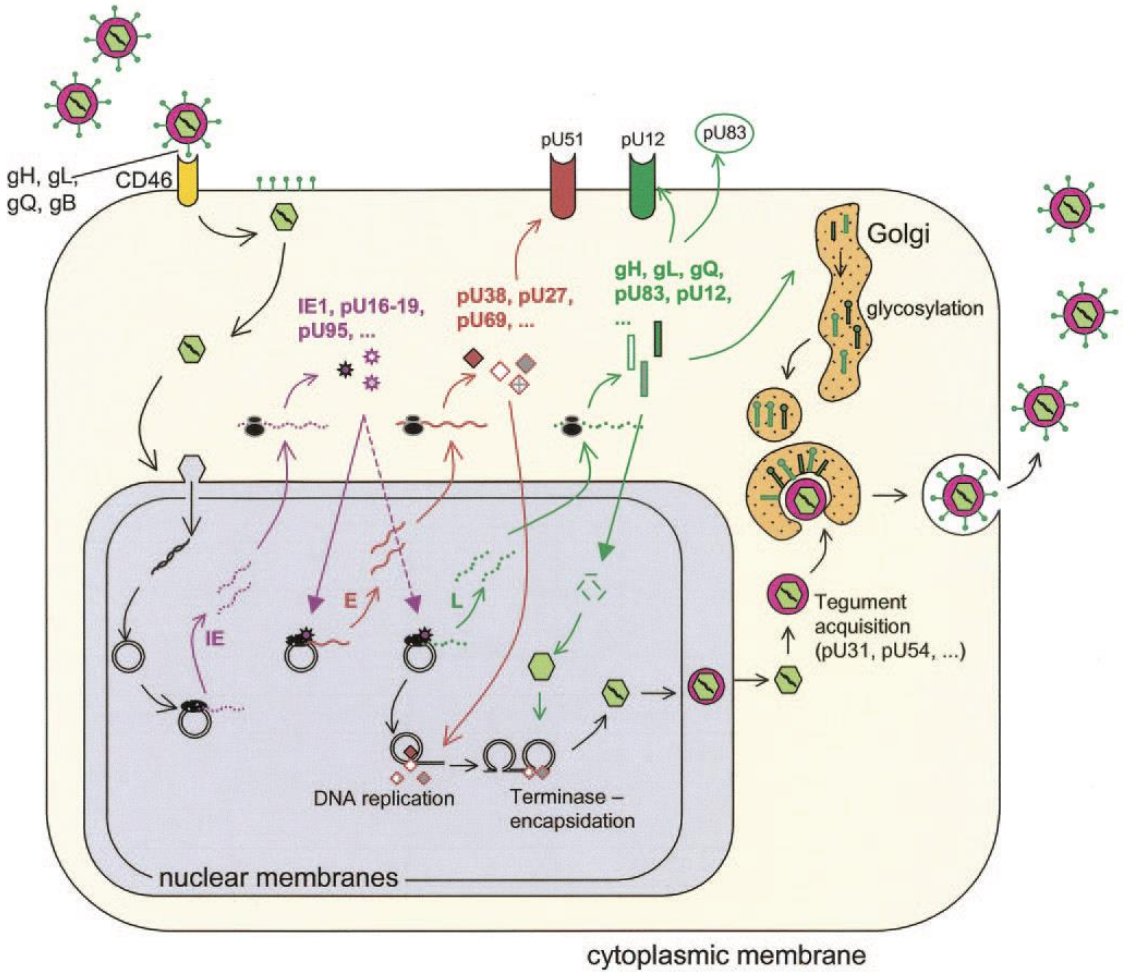
(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=human+herpesvirus+6a 1.8.2013)

3.5 Životní cyklus HHV-6

3.5.1 Replikace

Poté co navázáním virového glykoproteinu na buněčný receptor vznikne stabilní vazba virové partikule na buňku, dojde k fúzi virové obálky s buněčnou membránou. Vzhledem k podobnosti betaherpesvirů jsou buněčné procesy pravděpodobně podobné jako u lépe prozkoumaného CMV. Kapsida obalená jen proteiny tegumentu za účasti mikrotubulárních systémů buňky putuje k jádru, do kterého se inkorporuje virová DNA (Ogawa-Goto, Tanaka aj. 2003). Podobně jako u ostatních hepesvirů se původně lineární virová DNA v jádře cirkularizuje a za účasti buněčných proteinů se virus replikuje pomocí rotující kružnice. Pro přepis své DNA a následné pomnožení využívá virus proteiny tří kinetických skupin (Obr. 4) (De Bolle, Naesens aj. 2005):

1. Proteiny brzké rané fáze (intermediate early – IE), jsou částečně zastoupeny v tegumentu, k jejich další syntéze pak dojde během několika minut po vstupu viru do buňky. Regulují expresi dalších genů, inhibují tvorbu buněčných interferonů a ovlivňují buněčné pochody.
2. Proteiny pozdní rané fáze (early – E) jsou závislé na syntéze IE bílkovin a podílejí se především na metabolismu virové DNA a její replikaci.
3. Proteiny pozdní fáze (late – L) produkují především stavební materiál pro nové virové partikule (Oster and Hollsberg 2002).



Obr. 4 Replikační cyklus

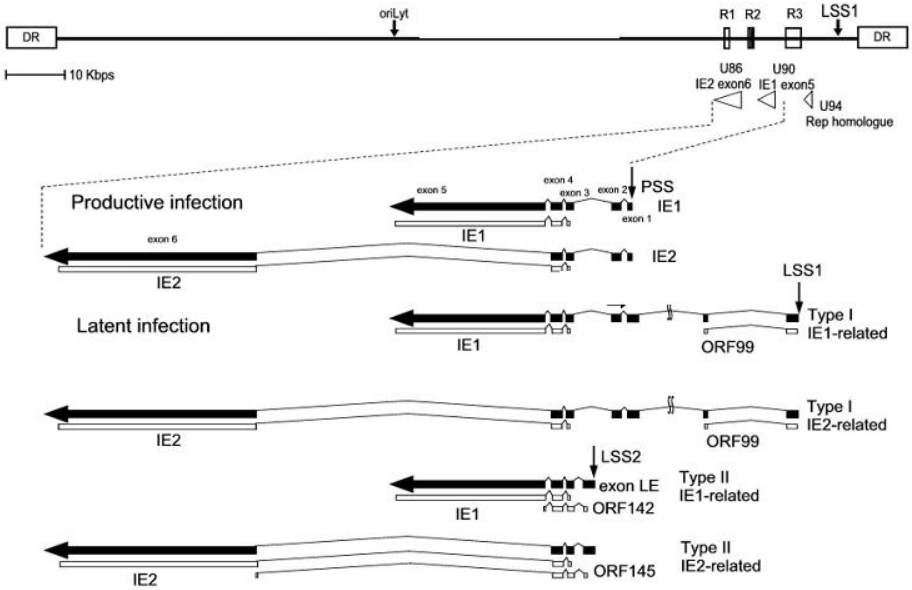
(De Bolle, 2005)

Virová DNA potřebuje ke své replikaci 7 virem kódovaných proteinů. Jedná se o vazebný protein genu U73 (Obr. 3), který se naváže v místě pro replikaci (oriLyt) a denaturuje část kruhového virového genomu (Dewhurst, Dollard aj. 1993). Tato mezera je udržována helikázovým komplexem skládajícím se z U43, U74 a U77 genových produktů a poskytuje tak vazebné místo na „zaostávajícím řetězci“. Jednovláknová DNA je stabilizována vazebným proteinem kódovaným genem U41, dokud se druhý řetězec nenasyntetizuje za pomoci virové DNA polymerázy (pU38) a růstového faktoru (pU27) (Obr.3) (Teo, Griffin aj. 1991). Vytvoří se dlouhé vlákno dsDNA kódující sérii virových genomů (konkatemer DNA), které se rozštěpí v místech štěpného signálu (pac-1, pac-2) nacházející se v koncových oblastech repetitivních sekvencí (Obr. 3) a jednotlivé genomy se uloží do nukleokapsid, které mezitím byly vytvořeny v cytoplasmě a dopraveny zpět do jádra.

Nukleokapsidy prostoupí jadernou membránou, v cytoplasmě se obalí proteiny tegumentu a jsou glykosylovány za účasti Golgiho aparátu. Kompletní virion prostoupí endocytózou membránu buňky a dojde tak k uvolnění virových partikulí do extracelulárního prostoru (Torrisi, Gentile aj. 1999). Jeden cyklus replikace, tedy od prvního kontaktu viru s buňkou až po uvolnění nových virionů, trvá 72 hodin (Black, Sanderlin aj. 1989).

3.5.2 Latentní infekce

Stejně jako ostatní lidské herpesviry i HHV-6 je schopen přežívat v hostitelských buňkách i po primární infekci. V IE-A oblasti virového genomu, která se nachází v oblasti středových repetic byly identifikovány dva transkripty asociované s latentní infekcí (H6LT I a II). Tento lokus rovněž kóduje ORF proteiny produktivní infekce zahrnující IE1 a IE2 – produkty genů U89, 90 a U86, 87, 90. Přestože regulace transkripce proteinů produktivní nebo latentní infekce dosud nebyla objasněna, faktem zůstává, že produkty latentní infekce sdílejí stejné geny jako produky lytické infekce, ale jejich transkripce začíná na jiném místě. Do latentních transkriptů H6LT I a II jsou rovněž zapojeny krátké ORF 99, 142, 145 (Kondo, Nozaki aj. 2003) a jsou zahrnuty v jejich proximální části (Obr. 5).



Obr. 5 Latentní transkripty

(upraveno dle Kondo, 2003)

V horní části jsou schematicky znázorněny vnitřní repetice (R1, R2, R3), počátek replikace (oriLyt) a struktura přímé repetice (DR) a geny pro proteiny související s latentní nebo produktivní infekcí. V dolní části tenké čáry znázorňují introny, silné šípy exony. Dále jsou

zde vyobrazeny malé ORF a počáteční exony pro přepis latentních transkriptů H6LTs jsou označeny LSS1 a 2. Postavení počátečního exonu pro produktivní infekci (PSS) je rovněž uvedeno.

Zvýšená exprese H6LT I a II byla pozorována těsně před vznikem virové reaktivace a to jak *in vivo* u nemocných po nástupu imunosupresivní terapie, tak *in vitro* poté co byly kultury nesoucí latentní HHV-6 stimulovány phorbolem. Latentní transkripty zřejmě zasahují do regulace přepisu E1, E2 proteinů a můžou stimulovat přechod k produktivní infekci (Kondo, Shimada aj. 2002). Přestože mechanismus ustanovení latentní infekce není příliš znám, dalším ostře sledovaným proteinem v této souvislosti je pU94 jehož přepis je vyšší při latentní oproti lytické infekci (Rotola, Ravaioli aj. 1998). Tento protein je rovněž popsán v souvislosti s Ci-HHV-6 (viz níže). Virus v latentní formě byl nalezen ve slinných žlázách, mozkové tkáni (Jarrett, Clark aj. 1990; Chan, Ng aj. 2001). Latentní infekce byla rovněž prokázána v monocytech a progenitorových buňkách v kostní dřeni (Kondo, Kondo aj. 1991; Luppi, Barozzi aj. 1998).

3.6 Buněčné interakce HHV-6

Při primoinfekci, virové reaktivaci i při ustanovení latentní infekce dochází k řadě interakcí mezi buňkami hostitele a virovými proteiny i celými virovými partikulemi. Pro virus je v určité fázi infekce výhodné, aby zůstal skryt před imunitní reakcí, jindy zase může využít svůj proteinový aparát k nalákání hostitelských buněk do místa svého výskytu a snadnější infekci dalších buněk.

3.6.1 Imunomodulace

Při virové infekci jsou IL-2 aktivovány T lymfocyty a tak umožní další pomnožení viru v hostitelských buňkách. Transkripce CD3 je v napadených buňkách utlumena virovým proteinem pU24, což vede ke snížení povrchového vyjádření na receptoru CD3, to vede k jeho nižší expresi na buněčném povrchu a tedy k nižší tvorbě komplexu CD3/TCR. Touto manipulací imunitního systému virus inhibuje možnou buněčnou aktivaci T lymfocytů a následnou sekreci cytokinů. Další z virových proteinů pU21 snižuje expresi MHC molekuly I. třídy na buněčném povrchu, čímž zamezí vystavení fragmentů HHV-6 na buněčném povrchu a buňka tak není rozpoznána CD8+ cytotoxickými lymfocyty (Flamand, Komaroff aj. 2010). HHV-6 také inhibuje syntézu interferonu gama (INF-γ), cytokinu regulujícího odpověď CD4+ T lymfocyty a NK buněk (De Bolle, Naesens aj.

2005). V případě CD4+ T lymfocytů imunitní systém na základě podnětů vlastních i cizorodých buněk a buněčných elementů rozhoduje mezi Th1 (zánětlivé T-lymfocyty) a Th2 (regulační, vedoucí k produkci protilátek) odpovědí. Ze sledování produkce cytokinů - odpovědí organismu na infekční agens jsou získávány rozporuplné výstupy. Může to být způsobeno použitím různých typů buněk nebo buněčných populací v *ex vivo* modelech, které plně nereprezentují *in vivo* regulační pochody. Interleukin (IL)-12 hraje klíčovou roli při vyvolání odpovědi typu Th1. IL-10 je jedním z efektorů v přesunutí rovnováhy směrem k Th2 odpovědi. Při sledování HHV-6 infikovaných mononukleárních buněk periferní krve (PBMC) byl zaznamenán nárůst IL-10, který inhiboval expresi IL-12. Infikované monocyty mohou snižovat hladinu IL-12. Zároveň v obou případech produkce IL-12 klesala v reakci na nárůst produkce IFN-gama (Li, Goodrich aj. 1997). Z toho lze vyvodit závěr, že HHV-6 infekce může vést k inhibici Th1. Naproti tomu, pět dnů po infekci HHV-6, SupT1 buňky exprimovaly vyšší hladiny IL-18 a dalších prozánětlivých genů, zatímco úroveň IL-12 byla beze změny a IL-10 vykazoval nižší aktivitu IL-10 (Mayne, Cheadle aj. 2001). Výsledky těchto studií vedou k závěru, že HHV-6 aktivuje převážně Th1 odpověď.

U HHV-6B oproti HHV-6A byla pozorována snížená citlivost na protivirovou odpověď interferonů (IFN-alfa/beta), které přes tyrosin kinázovou signalizaci zprostředkovávají intracelulární protivirovou odpověď. IE1 protein HHV-6B zabraňuje vazbě ISGF3 (Interferon-stimulated gene factor 3) na ISG (Interferon-stimulated gene) a tím znemožňuje jeho správnou transkripci, čímž dochází k nižší produkci protivirové odpovědi. Výrazně odlišný vliv na signalizační interferonové dráhy může mít vliv na značný biologický rozdíl mezi HHV-6A a B (Jaworska, Gravel aj. 2010).

HHV-6 vyvinul účinnou metodu jak manipulovat s imunitním systémem hostitele. Získal do svého genomu získal analogy G-vázaných buněčných receptorů, které zasahují jak do vnitřních pochodů buňky, tak fungují jako atraktanty pro chemokiny a zasahují do regulace probíhající imunitní odpovědi (De Bolle, Naesens aj. 2005).

Protein genu U12 (pU12) je analogem k funkčním receptorům chemokinů CCR1, 3, 5. V hostitelské buňce je přepisován jako pozdní protein. pU12 aktivuje chemokin RANTES (regulated on activation normal T cell expressed and secreted) označovaný rovněž jako CCL5 regulující protivirovou odpověď organismu. MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) a MIP 1 alfa (macrophage inflammatory proteins) označovaný rovněž jako CCL3, aktivují buňky vedoucí k zánětu (Isegawa, Ping aj. 1998).

Protein genu U51 (pU51) patřící mezi časné virové proteiny, může regulovat buněčné procesy vedoucí ke zvýšení virové replikace a zároveň tlumí apoptotické odpovědi. Váže RANTES a tlumí transkripci tohoto chemokinu (Tadagaki, Yamanishi aj. 2007).
Zatímco geny U12 a U51 patří do super rodiny genů US22 a nachází se i u ostatních beta herpesvirů, protein ORF U83 (pU83), poslední z funkčních analogů buněčných receptorů pro chemokiny má výhradní zastoupení jen u HHV-6. pU83 působí jako chemoatraktant pro makrofágy Th1 odpovědi (Zou, Isegawa aj. 1999). Sekvenční analýza ukazuje asi 13% rozdíl mezi proteinem u HHV-6A a HHV-6B. Zatímco u HHV-6B je nejspíš aktivní jen jako CCR2, HHV-6A vykazuje aktivitu jako CCR1, CCR4, CCR5, CCR6 a CCR8. Synergií pU83, pU51 a pU12 může být infikovaný lymfocyt chemotaxí naveden do lymfatických uzlin, tedy do místa bohatého na další potenciální hostitelské buňky (Flamand, Komaroff aj. 2010).

3.6.2 Transaktivační aktivita

Přestože byl HHV-6 u pacientů nakažených HIV-1 navržen jako kofaktor k propuknutí Syndromu získaného selhání imunity (AIDS) (Lusso, Ensoli aj. 1989), o tom zda HHV-6 ovlivňuje HIV jako agonista či jako antagonista, jsou rozporuplné zprávy. Při experimentech *in vitro* bylo zjištěno, že několik proteinů HHV-6 má schopnost transaktivovat LTR promotor HIV (pDR7, pU3, IE proteiny, pU94) a tím stimulovat jeho produkci (De Bolle, Naesens aj. 2005). Oba viry jsou považovány za B-lymfoproliferativní, ale mohou se replikovat v CD4+ T lymfocytech, stejně jako HIV. Navíc HHV-6 může posílit expresi CD4+ na buňkách citlivých k HIV infekci (Flamand, Romerio aj. 1998). Oproti tomu bylo prokázáno, že HIV-1 kmeny používají lidský CC-chemokinový receptor CCR5 jako koreceptor pro svůj mezibuněčný přenos. Mutace CCR5 může zabránit infekci zamezením své povrchové exprese, což má za následek nižší progresi AIDS. Virový chemokin U83, který se váže na CCR5 s vyšší afinitou než lidské chemokiny, obsazuje jejich vazebná místa a vede tím k inhibici chemotaxe lidských leukocytů.Virový chemokin U83 podporuje lokální imunitu vůči HIV-1 a působí jako inhibitor jím způsobené infekce (Catusse, Parry aj. 2007). Pro možné zpomalující účinky nástupu AIDS svědčí studie zaměřená na první rok života HIV pozitivních dětí při níž bylo zjištěno, že kvůli nižšímu počtu CD4+ buněk prodělalo méně dětí v prvním roce svého života primoinfekci HHV-6. U těchto dětí byl zaznamenán rychlejší průběh AIDS (Kositanont, Wasi aj. 1999).

U viru HHV-6A byla prokázána schopnost reaktivovat v B-lymfocytech z latence EBV (Cuomo, Angeloni aj. 1995). U HHV-8 infekce dokáže HHV-6 podpořit jeho replikaci a vzájemným vlivem na cytokinovou signalizaci oba viry vytvoří vhodné prostředí pro svou koexistenci (Lu, Zeng aj. 2005). Vzájemné interakce mezi blízce příbuznými betaherpesviry dosud nebyly prokázány, ale pro myšlenku, že na sebe vzájemně působí, svědčí jejich reaktivační profil po transplantaci (viz. kapitola 3.2.2).

3.6.3 Nastavení infikované buňky k apoptóze

Hostitelská buňka při lytické infekci zahájí řadu antivirových odpovědí, z nichž je v konečném důsledku buňka dovedena k programované buněčné smrti. Intracelulární cesty často vznikají z mitochondrií, extracelulární jsou indukované cytokiny. Jedním z nich je tumor nekrotizující faktor alfa (TNF-alfa), který signalizuje prostřednictvím receptoru TNF (TNFR1). Spojením s adaptorovým proteinem TRADD (Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein) vzniká komplex I (Chan, Chun aj. 2000), který spouští signalizaci vedoucí k translokaci nukleárního faktoru kappa B (NF-kappaB) a vzniku nového komplexu II v cytoplazmě, který kaspázovou signalizací spouští apoptozu (Li, Zhang aj. 2006).

U buněk infikovaných herpesviry např. EBV byla prokázána inhibice apoptózy intracelulárními interakcemi virového latentního membránového proteinu 1 (LMP-1) na mitochondriálních strukturách, kterými zamezí vzniku komplexu I a tím i spuštění další signalizace (Kieser 2008). Také u HHV-6B byla potvrzená interakce mezi virovým proteinem U20 s buněčnými komplexy asociovanými s TNF-alfa. *In vitro* bylo prokázáno výrazné tlumení apoptozy u infikovaných buněk a jejich stimul k přežití. Zároveň se předpokládá, že *in vivo* může koinfekce B lymfocytů EBV s HHV-6B ještě navýšit možnost přežití nakažených buněk a jejich klonů a tím se výrazně zvyšuje riziko vzniku lymfomů v důsledku kooperativního účinku proteinů LMP-1 a U20 (Kofod-Olsen, Ross-Hansen aj. 2012).

Pro možný onkogenní potenciál HHV-6 svědčí transformační aktivita produktu virového genu DR7. Buňky exprimující protein DR7 mají tumorigenní vlastnosti prokázané na experimentech *in vivo*. Exprese proteinu DR7 na maligních buňkách u pacientů s Hodgkinovým lymfomem způsobuje molekulární změny na dalších buňkách typické pro lymfoproliferativní poruchy (Lacroix, Collot-Teixeira aj. 2010). Zatímco např. CMV a HHV-8, které za účasti virových proteinů využívají protoonkogen p53 v jádře buňky ke

svému pomnožení (Fortunato and Spector 1998; Katano, Ogawa-Goto aj. 2001), virové proteiny kódované v HHV-6 genomu (DR7, ORF 1, ORF 14) interagují s p53 a zadržují ho v cytoplazmě (Kashanchi, Araujo aj. 1997; Takemoto, Koike aj. 2005). Dosud nebylo objasněno, proč se tak děje, ale nepochybně jde o zásah do buněčných pro-apoptotických drah.

Dalším zajímavým genovým produktem HHV-6 je cytoplasmatický protein U95. Reguluje transkripci IE proteinů, je zapojen i do ustanovení latentní infekce a zároveň interaguje s mitochondriálním proteinem GRIM-19. Během HHV-6B infekce byl pozorován pokles mitochondriálního membránového potenciálu, který se potlačením pU95 vrátil k normálu, lze tedy předpokládat možný cytopatický dopad virového proteinu na buněčné pochody (Yeo, Isegawa aj. 2008).

3.7 Chromozomálně integrovaný HHV-6 (Ci-HHV-6)

Přítomnost Ci-HHV-6 byla poprvé popsána v roce 1993 (Luppi, Marasca aj. 1993), o rok později bylo identifikováno místo integrace: chromozom 17p13.3 (Luppi, Barozzi aj. 1994). Další studie potvrdily na základě FISH, že se do lidských chromozomů můžou integrovat obě varianty viru (Torelli, Barozzi aj. 1995). A v roce 1999 Daibata a kol. popsali vertikální přenos Ci-HHV-6 přes tři generace s klasickou mendelovskou dědičnost (Daibata, Taguchi aj. 1999). Detekce virové DNA ve vlasových folikulech u pacientů Ci-HHV-6 a to v poměru 1 kopie viru na 1 vlasový folikul (Ward, Leong aj. 2006) a fakt, že virová DNA se nachází v různých tkáních v celém těle u pacientů s Ci-HHV-6 (Hubacek, Virgili aj. 2009) svědčí pro to, že Ci-HHV-6 je dědičný. Další možností může být, že Ci-HHV-6 vznikají přímou infekcí spermie nebo vajíčka. Během fertilizace pak gameta obsahující Ci-HHV-6 přenese informaci do zygoty, která se dále vyvine do embrya a poté v plod nesoucí v sobě jednu kopii Ci-HHV-6 v každé somatické buňce (Morissette and Flamand 2010). Většina (86 %) transplacentárně přeneseného HHV-6 souvisí s integrací viru u matky. Identifikací sekvenčně shodného gB u matky a v pupečníkové krvi se podařilo nepřímo prokázat, že se integrovaný virus reaktivuje (Gravel, Hall aj. 2013).

V roce 2007 byl popsán přenos HHV-6 při HSCT bez jasně definovatelných obtíží způsobených s HHV-6. U pacientů (a jejich dárců) s primoinfekcí či reaktivací se potvrdila Ci-HHV-6 a nebyla u nich nasazena virostatická terapie (Kamble, Clark aj. 2007). Od poloviny minulého desetiletí je věnována větší pozornost správné interpretaci výsledků při podezření na Ci-HHV-6.

3.7.1 Diagnostika Ci-HHV-6

Jak je již napsáno výše, při detekci herpetických virů se dnes ve větší míře užívá sérologická stanovení protilátek nebo různé aplikace PCR z různých buněčných materiálů. Pro rozpoznání viru integrovaného do lidské DNA se ukázala být zcela nevhodná plazma a sérum. V těchto materiálech se nachází různé množství lidských buněk a DNA z nich extrahovaná nemá výpovědní hodnotu pro rozlišení viru integrovaného v lidském genomu nebo pocházejícího z virových partikulí (Pellett, Ablashi aj. 2012). Pokud se jako zdroj DNA použije plná krev nebo PBMC při opakovaném stanovení lze získat stejné kvantity nukleových kyselin (bez exponenciálního nárůstu hladiny nukleových kyselin v případě reaktivace nebo primoinfekce). U člověka s normálním krevním obrazem by se hodnoty zjištěných virových nukleových kyselin měly pohybovat okolo 320000 kopií HHV-6 DNA/ml (Hubacek, Hrdlickova aj. 2009; Clark, Nacheva aj. 2006), je ale nutno zohlednit možné negativní vlivy na extrakci nebo PCR. Pro vyloučení vlivu inhibice PCR je možné výsledky normalizovat přes některý z lidských genů (např: albumin viz výše). Za předpokladu, že virus je integrován do každé somatické buňky by poměry nukleových kyselin (získaných za stejných podmínek) pro lidský a virový gen měly být v poměru 1:1. Je také možné Ci-HHV-6 potvrdit na bezkrevné tkáni (vlasy, nehty). Další možností jak potvrdit Ci-HHV-6 a zároveň určit místo jeho integrace, je FISH (Morissette and Flamand 2010).

3.7.2 Lidské telomerické oblasti v souvislosti s Ci-HHV-6

Znalost biologie lidských telomer může hrát rozhodující roli v pochopení procesu integrace a možné replikace viru. Délka telomer v somatických buňkách je 5-15 kb a po každém buněčném dělení se ztratí 250-300 bp od konce chromozomu. Každou syntézu DNA vlákna zahajuje úsek DNA a k němu komplementární RNA. Na 3´konec tohoto startovacího primeru nasedne DNA polymeráza a syntetizuje DNA vlákno. Po ukončení syntézy dojde k odstřihnutí startovacího primeru na 5´konci nového vlákna, tento primer je pak enzymaticky odstraněn. Když buňka absolvuje určitý počet dělení a její chromozomy se patřičně k tomu zkrátí dosáhne tak Hayflickova limitu. Buňce se pak může prodloužit život aktivováním reverzní transkriptázy (telomerázy), která přidává repetitivní sekvence TTAGGG ke 3´konci vlákna DNA, čímž prodloužít délku telomer. Proces prodlužování telomer telomerázovou aktivitou byl zjištěn v zárodečných buňkách, rakovinných buňkách a v kmenových buňkách. Běžně je však buňka po dosažení Hayflickova limitu navedena

k řízené smrti - apoptóze. Telomerické oblasti za účasti Sheltrinova komplexu proteinů chrání chromozomy před fúzemi, chromozomálními zlomy a inhibují telomerázovou aktivitu (Riethman 2008).

Fenomén integrace lidských herpesvirů včetně HHV-6A a HHV-6B do telomerických a subtelomerických oblastí v průběhu latentní infekce dosud není zcela prozkoumaný, ale je nepochybné, že integrace probíhá rekombinací mezi koncovými oblastmi virového genomu, kde jsou zakódované hexamery nukleotidů komplementární s telomerickými oblastmi savčích chromozomů (Thompson, Choudhury aj. 1994).

3.7.3 Další lidské herpesviry integrující se do lidského genomu

Na rozdíl od HHV-6 se integrace EBV a HHV-8 zřejmě týká jen ustanovení latentní infekce v organismu a stabilizaci epizomální DNA v jádře hostitelské buňky. Do ustanovení latence EBV s dočasnou integrací se zapojuje virový protein EBNA-1 (Epstein-Barr virus nuclear antigen) u HHV-8 se integrace účastní virový protein LANA (latency-associated nuclear antigen) (Ballestas, Chatis aj. 1999; Marechal, Dehee aj. 1999). V obou případech virové proteiny ve spolupráci s telomerickým vazebným proteinem (TRF2) integrují epizomální virový genom díky jimi kódovanými TTAGGGTTA repetitivními sekvencemi – nedokonalými repeticemi komplementárními k savčím telomerickým repeticím. V případě EBV byla zaznamenána různá místa integrací epizomické DNA do metafazických chromozomů a to zejména v nekódujících shlucích heterochromatinu (Takakuwa, Luo aj. 2004).

Gamaherpesviry EBV i HHV-8 jsou lidské herpesviry, které se integrují do lidského genomu a zároveň jsou nejčastěji asociovanými lidskými herpesviry asociovanými s maligními onemocněními. HHV-8 byl identifikován v roce 1994 u pacientů s AIDS z tkáně Kaposiho sarkomu (Chang, Cesarman aj. 1994). EBV je asociován s Burkittovým lymfomem, nasofaryngeálním karcinomem, Hodgkinovým lymfomem (HL) a dalšími B a T buněčným lymfoproliferativním onemocněním. HL je charakteristický maligními Reed-Sternbergovými buňkami (RSC) (Wu, Mann aj. 1990). Ty ve většině případů vznikají z pre-apoptických zárodečných buněk B lymfocytů. Přestože mají inaktivovanou Ig-V oblast, unikají apoptóze, do buněčného signalizačního systému se mohl svými transaktivačními mechanismy zapojit EBV (Kuppers, Schmitz aj. 2005). O možnou roli HHV-6 obzvlášť v součinnosti s EBV v patogenezi HL se vede široká diskuse. Podle imunohistochemické studie, kdy byla prozkoumána tkáň nádorů 103 pacientů s HL,

Lacroix a kol. identifikovali převahu EBV a HHV-6 infikovaných lymfocytů a histiocytů. Jiná studie testovala vliv virových lytických a latentních proteinů na RSC, ale jejich vliv byl jen velmi omezený (Lacroix, Collot-Teixeira aj. 2010).

Vliv na histologicky potvrzenou progresi angioimunoblastického T-buněčného lymfomu dokazují zvýšené virové nálože EBV a HHV-6 nalezené v postižené tkáni (Zhou, Attygalle aj. 2007). HHV-6 může rovněž způsobit komplikace a rychlejší průběh T-buněčné leukémie disregulací signalizace IL-2 (Ojima, Abe aj. 2005).

3.7.4 Mechanismus chromozomální integrace MDV

Dalším herpetickým virem, tentokrát patřícím mezi alfa-herpesviry, u kterého dochází k integraci do hostitelského genomu kura domácího je Marek´s disease virus (MDV). Jeho genom se skládá z unikátních sekvencí (U), koncových opakujících se sekvencí (Terminal repeats - TR) a vnitřních opakujících se sekvencí (Internal repaets - IR) (Cebrian, Kaschka-Dierich aj. 1982) podobně jako HHV-6. Mezi TR a IR se nachází pravidelné hexamery (TAAGGG)n. Tyto sekvence jsou typické pro telomerické oblasti chromozomů. Během latentní infekce se lineární genom dlouhý asi 180kb integruje na různá místa v telomerických oblastech kuřecích chromozomů a to do všech buněk (Kishi, Bradley aj. 1991). V souvislosti s onkogenním charakterem MDV může být zajímavá skutečnost, že gen pro virovou RNA telomerázu (vTR) je z 88% identický s genem RNA telomerázy kuřecí (cTR). Sekundární struktura obou telomeráz je takřka totožná a tak může vTR nahradit cTR ve spojení s buněčnou telomerázovou transkriptázou (TERT) (Fragnet, Blasco aj. 2003). Exprese virového onkogenu Meq a virové telomerázy vTR navozuje transfomaci T lymfocytů a vede k rychlému vytvoření tumorů a lymfomů asociovaných s T lymfocyty (Delecluse and Hammerschmidt 1993).

3.7.5 Mechanismus chromozomální integrace HHV-6

U virů HHV-6A a HHV-6B lze rovněž předpokládat zapojení opakujících se sekvencí viru a proteinů Sheltrinova komplexu při ustanovení latence při integraci celého virového genomu. Aby došlo k interakci mezi telomerami a virem, je zřejmě potřeba ještě další faktor. Vzhledem k tomu, že i nejbližší příbuzný mezi viry HHV-7 kóduje ve svém genomu opakující se sekvence, ale přesto nebyla zaznamenána jeho integrace do lidských chromozomů, zvažuje se jako kandidátní gen ORF U94, který je specifický pro HHV-6. Jako další argument pro přiznání podílu na virové integraci je fakt, že produkt tohoto genu

je sekvenčně podobný (24% identických aminokyselin) s proteinem REP68/78 parvoviru adeno-asociovaného viru (AAV-2). Protein REP68/78 má při integraci viru 3 funkce - vazba na DNA, endonukleázová a helikázová aktivita (Dhepakson, Mori aj. 2002). Přestože u proteinu ORF U94 byla z těchto schopností experimentálně prokázána jen DNA-vazebná aktivita, mutační analýza REP68 určila několik klíčových aminokyselin, které jsou nezbytné pro zbylé funkce, a které jsou zachovány v U94 (Walker, Wonderling aj. 1997; Walker, Wonderling aj. 1997).

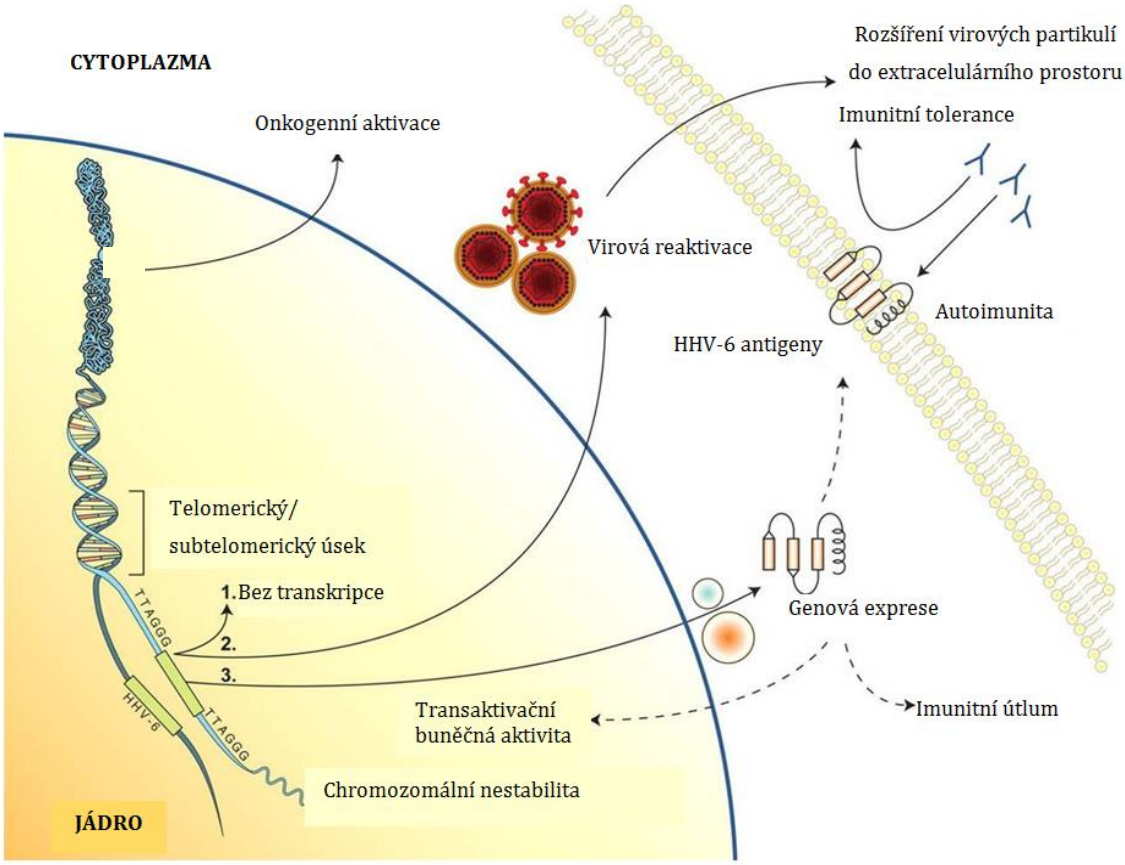
3.7.6 Možné dopady Ci-HHV-6 na lidský organizmus

Virová DNA se během svého životního cyklu v jádře vyskytuje ve třech různých formách. Ve virionu a při vstupu do buňky je virový genom lineární. Poté se v jádru cirkularizuje do formy epizomické DNA a během replikace virus vytvoří dlouhé vlákno opakujících se genomů DNA. Pokud budeme pro zjednodušení této úvahy předpokládat, že se rekombinačními pochody integruje jen jedna forma DNA, existují tři možnosti a z toho vyplívající délka integrovaného fragmentu virového genomu. Lineární forma DNA, která vstupuje do jádra, je typická pro uložení DNA informace ve virové partikuli. Pokud dojde k integraci v pravé oblasti repetitivních sekvencí přijde virus o sekvence štěpného signálu 2 umístěné vpravo v krajních oblastech genomu. V případě, že by došlo k integraci v levé oblasti repetitivních sekvencí byla by zaintegrována jen malá část genomu bez genů potřebných k replikaci nebo sestavení virových obalů. Při rekombinaci episomální virové DNA s telomerickými oblastmi by nastala podobná situace jako u lineární formy DNA. Za předpokladu, že HHV-6 genom může být replikován buněčnou DNA polymerázou, a že se později připojí k replikaci i virová DNA polymeráza, můžou být generovány neúplné virové genomy. Pokud v sobě bude mít dlouhé vlákno opakujících se genomů (konkatemer) zahrnutá nejméně dvakrát dvě štěpná místa pac2/x/pac1, mohl by se virus replikovat v celé své délce a/nebo vyštěpit z místa své integrace (Morissette and Flamand 2010).

Otevírá se tedy několik možností:

1. Virus se nepřepisuje, ale samotná jeho integrace může způsobit destabilizaci chromozomu
2. Jedná se o nový typ latence: virus se může z místa své integrace vyštěpit a kompletně se replikovat.

3. Dochází sice k přepisu některých proteinů, ale virový genom se nemůže vyštěpit a k lytické infekci nedochází (Obr. 6).



Obr. 6 Vliv Ci-HHV-6 na lidský organismus

(Upraveno dle Morissette a Flamand, 2010)

Ze třech případů, které můžou v souvislosti s HHV-6 integrovaným v lidském genomu nastat, vyplývají různé dopady na organismus (Obr. 6). Samotná integrace může způsobit porušení apoptotických drah a může zde být souvislost s onkogenním potenciálem těchto buněk. Pokud se virus do určité míry přepisuje, závisí na tom, které konkrétní geny je schopný transkribovat. Vzhledem ke schopnostem viru manipulovat s imunitním systémem hostitele může být působení přepisovaných virových proteinů na buněčnou signalizaci značně různorodé. Pokud je virus schopný se vyštěpit, může se zřejmě při oslabení organismu reaktivovat stejně jako z latentní infekce, kdy je virová DNA uchována ve formě epizomální DNA.

4 Laboratorní přístroje a pomůcky

4.1 Laboratorní přístroje a spotřební materiál

- Pipety - Eppendorf a Finnpipette
- Třepačka MS 3 basic - Ika
- Centrifuga Mini spin plus - Eppendorf
- Suchý termoblok - Eppendorf
- Real –time termocycler 7300 ABI - Applied Biosystem
- Elektroforetické vany + příslušenství - Thermo scientific
- Transiluminátor TFX-26MC - Vilber Lourmat
- Systém AlphaDigiDoc^{TM} RT - Alpha Innotech
- Fotoaparát OLYMPUS SP500uz - Olympus
- Centrifuga chlazená - Hettich
- Laminární box Herasafe - Thermo scientific
- Nanodrop 1000 - Thermo scientific
- Coulter AcT 5 diff OV - Beckman coulter

4.2 Spotřební materiál

- Pipetovací špičky s filtrem - Sarstedt
- Mikrozkumavky - Eppendorf
- Zkumavky 1,5ml, 10ml, 15ml, 50ml - Sarstedt
- Zkumavky bez RNA 1,5ml - Invitrogen
- Real-time PCR desky - Applied Biosystems
- Real-time PCR stripy - Applied Biosystems
- Real-time PCR krycí folie - Applied Biosystems
- Petriho misky - Gama group
- Sterilní plastové pasteurky- Gama group
- Sterilní kultivační láhve (50 ml) - Sarstedt
- Podložní skla - Marienfeld
- QIAamp Blood Mini kit - Qiagen
- QIAamp Micro Kit - Qiagen

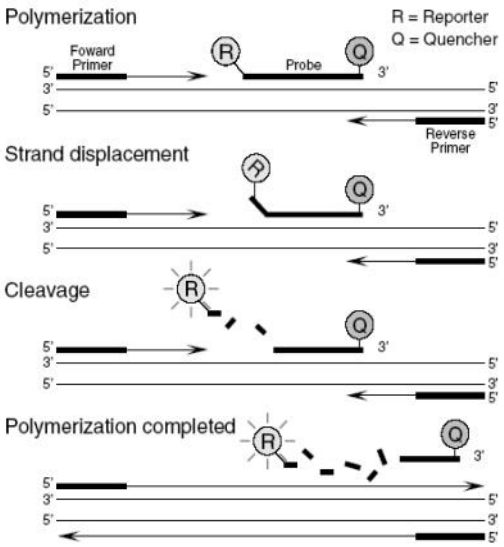
- *TOPO*® TA Cloning® *Kit* - Invitrogen
- Plasmid Mini kit - Qiagen
- Plasmid Maxi Kit - Qiagen
- Amp agar blue - Invitrogen
- Terrific Broth - Invitrogen

5 Metody

5.1 Kvantifikace virové nálože ve vzorcích a identifikace Ci-HHV-6

K analýze kontrolní skupiny jsme jako zdroj DNA sbírali nehty dobrovolných dárců, u vzorků pacientů s maligním onemocněním jsme jako zdroj DNA použili plnou krev a v případě vysoké virové nálože jsme podezření na Ci-HHV-6 potvrdili analýzou DNA z nehtů. V obou případech jsme k extrakci DNA použili kity firmy Qiagen, které fungují na principu vysoké DNA adsorpce na silikát v přítomnosti chaotropních solí. DNA se naváže na silikátový povrch. Opakovaným promýváním guanidinium thiokyanátem se odstraní kontaminující složky. DNA zůstává navázaná na silikát až do použití elučního pufru. V případě izolace z nehtů je třeba nejprve lyzovat keratin – protein, který je hlavní složkou tvořící nehet a představuje „mrtvou tkáň“, přestože obsahuje zbytky DNA.

Virovou a lidskou DNA jsme prostřednictvím specifických primerů detekovali polymerázovou řetězovou reakcí (PCR). Abychom mohli přesvědčivě zhodnotit kvantitu virové DNA využili jsme modifikované PCR, tzv. real time (RQ)-PCR, kdy stejně jako u kvalitativně zhodnoceného PCR probíhá v rámci teplotního profilu denaturace – rozpadnou se vodíkové můstky a z dvouvláknové DNA (dsDNA) se stanou nezávislé jednovláknové řetězce (ssDNA). Změna teploty umožní nasednutí primerů na řetězec DNA a elongaci neboli prodloužení – nasyntetizování dsDNA polymerázou. Při RQ-PCR je do reakce zahrnuta značená sonda komplementární k syntetizované sekvenci (Obr. 7). V průběhu reakce nasedne, a po uvolnění exonukleázovou aktivitou DNA polymerázy se uvolní flourofor, který emituje záření o určité vlnové délce, což je odečteno detekčním systémem (Obr. 7).

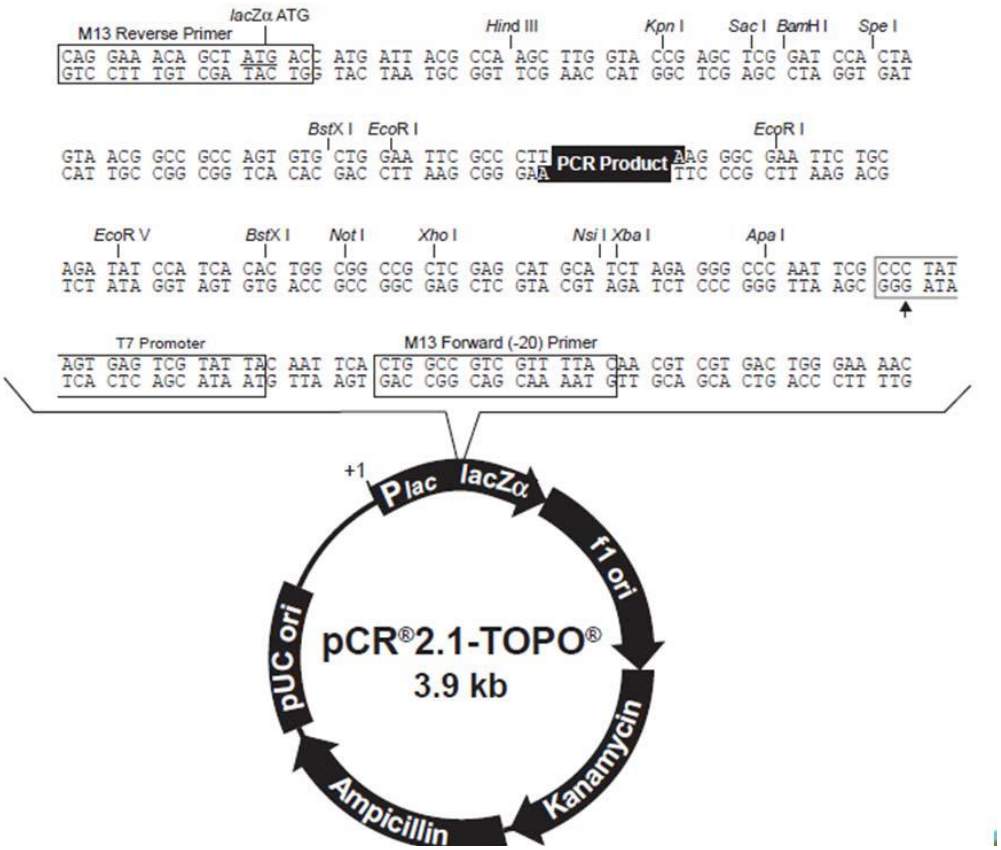


Obr. 7 Princip metody TaqMan

(http://www.dkfz.de/gpcf/lightcycler480.html 1.8.2013)

Systém TaqMan firmy Applied Bisosystems využívá sondy (próby), které mají na svém 5´konci reportérovou fluorescenční barvu (reporter) a na 3´konci fluorescenční barvu nazývanou zhášeč (Quencher).

K tomu abychom mohli dlouhodobě uchovat požadovanou virovou sekvenci a sestrojit stabilní kalibrační křivku, jsme využili metodu molekulárního klonování. Požadované sekvence nukleových kyselin se zaligují do plazmidu (Obr. 8), ten se následně pomnoží ve speciálně vyšlechtěné *E. coli*, která je schopna transformace cizí DNA. Z těchto bakterií se vyizoluje plazmidová DNA s vloženým inzertem požadované sekvence nukleových kyselin. Úplně a správně zaligovaný inzert se ověří sekvenováním se specifickými M13 primery (Obr. 8).



Obr. 8 Mapa klonovacího vektoru pCR 2.1

(http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcr2_1topo_map.pdf 1.8.2013)

Na obrázku je schematicky znázorněno: Multiple cloning site (MCS nebo polylinker) – krátká sekvence s unikátními místy pro restrikční enzymy, umožňující vložit insert do vektoru. pUC ori, f1 ori – počátek replikace v E. coli. Ampicilinová rezistence, poskytující výhodu při množení plazmidů v tekuté půdě s přídavkem antibiotika. Fragment LacZalfa (ß - galaktozidáza) leží v oblasti klonovacího místa. T7, Sp6 fágový promotor – T7, Sp6 RNA polymeráza transkribuje in vitro RNA. M13 protisměrné kontrolní primery, které jsou součástí kitu.

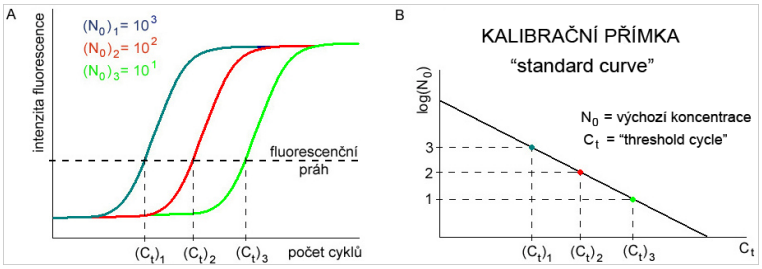
Z této stabilní DNA se zaklonovanými sekvencemi HHV-6 A a B se po změření na spektrofotometru a následném přepočítání získá dekadickým ředěním kalibrační křivka. Při sestrojení kalibrační křivky je třeba brát v úvahu obecné principy PCR, kdy dojde za ideálních podmínek s každým cyklem ke zdvojnásobení počtu kopií. Platí zde vztah:

$$\text{n-tý cyklus} = 2^n$$

Na ose x je logaritmus počáteční kvantity vzorku, na ose y je prahový cyklus (Obr. 9) tj. počet cyklů nutných k doamplifikování vzorku až do dohodnuté kvantity, do prahu. Z toho vyplívá rovnice pro sestrojení kalibrační křivky (Obr. 9):

$$\textit{prahový cyklus} = \textit{počátek} + \textit{sklon} * \log(\textit{kvantita})$$

Amplifikační křivka má logaritmický charakter. Pro sestrojení kalibrační přímky proložíme křivky fluorescenčním prahem a získané hodnoty zlogaritmujeme.



Obr. 9 Kalibrační křivka

(http://www.gyn-test.cz/metody-provadeni-testu/ 1.8.2013)

U zavedených esejí jsme používali standardy již dříve sestrojených kalibračních křivek, používaných v rutinní diagnostice a validovanými pomocí mezinárodních kontrol kvality (QCMD - quality control for molecular diagnostics).

5.1.1 Izolace DNA z plné krve

Chemikálie:

- QIAamp DNA Blood Mini kit - Qiagen
- Ethanol (96-100 %) - Penta

Dle návodu výrobce jsme nejprve zlyzovali plnou krev lyzačním pufrem (detergent rozpouští membrány a denaturuje bílkoviny) a enzymy (proteináza K štěpí bílkoviny na menší peptidy a RNáza A ničí RNA). Lyzát jsme nanesli na kolonku. Promývacími roztoky o klesající iontové síle jsme odmyli zbytky proteinů. Elučním pufrem se uvolnila DNA adherovaná na silikátovém povrchu. Podrobný návod výrobce v příloze 8.

5.1.2 Izolace DNA z nehtů

Chemikálie:

- QIAamp DNA Micro kit - Qiagen
- DTT (1M) - Sigma
- Ethanol (96-100 %) - Penta

K nehtům jsme přidali DTT a dle návodu nechali jsme vzorek třepat při 56°C 24h. Odebrali jsme supernatant, se kterým jsme dále postupovali dle návodu výrobce (Příloha 8).

5.1.3 Kvantifikace RQ-PCR

Chemikálie:

- HotStar Taq polymeráza - Qiagen
- dNTP - Sigma
- 6-carboxy-x-rhodamine (6-ROX) - Life technologies
- Primery a sondy - Metabion international
- Injekční voda (mini-plasco) - Braun

Ve všech vzorcích jsme kvantifikovali HHV-6 a albuminový gen metodou real time PCR (RQ-PCR) (parametry reakcí v tabulce 2 a 3) pomocí publikovaných metod (Gautheret-Dejean, Manichanh aj. 2002)(Pongers-Willemse, Verhagen aj. 1998). Sekvence se specifickými primery a sondami pro detekci HHV-6 a albuminového genu zobrazuje tabulka 4. V případě, že jsme detekovali virovou DNA a zároveň jsme ověřili správnost izolace nalezením lidského genu pro albumin, provedli jsme druhou analýzu DNA izolované z nehtů pro rozlišení HHV-6A a B.

HHV-6A a B jsme detekovali jednak metodou nested PCR (Hubacek, Muzikova aj. 2009) a zároveň nově zavedenou metodou RQ-PCR dle práce D. Boutolleau (Boutolleau, Duros aj. 2006). Primery byly navrženy tak, aby nasyntetizovaný PCR produkt dlouhý 166 bp ležel v oblasti U65-U66, stejně jako produkt již zaběhnuté eseje HHV-6, tak aby mohla být použita stejná diskriminační sonda a stejný poměr reagencií (Tab. 3). Přímý (forward) primer je pro obě HHV-6A i B stejný, zpětné (reverzní) primery (Tab. 4) se liší ve 4 nukleotidech. Senzitivita primerů byla autorem potvrzena na kohortě 113 vzorků DNA s již dříve potvrzenou pozitivitou HHV-6 (Boutolleau, Duros aj. 2006). Kvantifikaci HHV-6A a B jsme provedli u všech vzorků Ci-HHV-6 zahrnutých do naší studie tedy na 23 vzorcích. Kvantita virová nálože získaná z RQ-PCR HHV-6 přibližně korelovala s hodnotami získanými při kvantifikaci HHV-6A a B.

Samotné RQ-PCR reakce proběhly na přístroji 7300 ABI, přičemž každou detekce proběhla v duplikátu. Při optimalizaci primerů pro nově zaváděnou esej jsme teplotním gradientem nezjistili výkyvy senzitivity primerů k nasedací teplotě, pro zjednodušení při zavádění této eseje do rutinního provozu jsme přejali teplotní profil platný i pro vyšetření ostatních herpetických virů. Všechny reakce proběhly za stejného teplotního profilu (Tab. 5).

Tab. 2 Reagencie pro PCR albuminového genu

Reagencie	**µl na reakci**	**Finální koncentrace**
PCR voda	9,765	
pufr 10x+$MgCl_2$(15 mM)	1,5	1x+1,5 mM
$MgCl_2$(25 mM)	0,6	1 mM
dNTP (5mM)	0,3	100 µM
ROX barvička (100 µM)	0,1	0,67 µM
primer mix (20 µM)	0,375	0,5 µM
sonda (10 µM)	0,3	0,2 µM
HotMaster poly 5U/ul	0,06	0,02 U/ µl
DNA	2	
CELKEM OBJEM	15	

Tab. 3 Reagencie pro PCR HHV-6, HHV-6A, HHV-6B

Reagencie	**µl na reakci**	**Finální koncentrace**
PCR voda	8,115	
pufr 10x+$MgCl_2$(15 mM)	1,5	1x+1,5 mM
$MgCl_2$(25 mM)	0,6	1 mM
Glycerol 50%	1,5	5%
dNTP (5mM)	0,3	100 µM
ROX barvička (100 µM)	0,25	1,67 µM
primer mix (20 µM)	0,375	0,5 µM
sonda (10 µM)	0,3	0,2 µM
HotMaster poly 5U/ul	0,06	0,02 U/µl
DNA	2	
CELKEM OBJEM	15	

Tab. 4 Primery a próby

ALB-for	TGAAACATACGTTCCCAAAGAGTTT	Pongers-Willemse a kol., 1998
ALB-rev	CTCTCCTTCTCAGAAAGTGTGCATAT	Pongers-Willemse a kol., 1998
HHV-6-for	GACAATCACATGCCTGGATAATG	Gauthered-Dejean a kol., 2002
HHV-6-rev	TGTAAGCGTGTGGTAATGGACTAA	Gauthered-Dejean a kol., 2002
HHV-6 A+B-for	GACAATCACATGCCTGGATAATG	Boutolleau a kol., 2005
HHV-6 A-rev	TGGTAATGGACTAATTGTGTGTTGTTTTA	Boutolleau a kol., 2005
HHV-6 B-rev	TGGTAATGGACTAAGTGTGCGTTATTTTC	Boutolleau a kol., 2005
ALB-PROBE	vic dye-TGCTGAAACATTCACCTTCCATGCAGAT-quencher, blocked	Pongers-Willemse a kol., 1998
HHV6-PROBE	fam dye-AGCAGCTGGCGAAAAGTGCTGTGC-tamra	Gauthered-Dejean a kol., 2002

Tab. 5 Teplotní profil

DENATURACE	95°C	15:00
AMPLIFIKACE -cykly: 45x	94°C	0:15
	60°C	1:00

5.1.4 Hodnocení kalibrační křivky

Při výpočtu ideálního sklonu křivky jsme vycházeli z ideální situace, kdy se počet kopií zdesateronásobí:

$2x = 10$

$x = \log_2 10$

x = 3,32

Při hodnocení diagnostických vzorků a rovněž vzorků zpracovávaných v této práci měla kalibrační křivka sklon 3,2 – 3,8 a korelační koeficient dvou bodů kalibrační křivky stejné koncentrace DNA nebyla nižší než 0,98.

5.1.5 Molekulární klonování

Chemikálie:

- *TOPO*® TA Cloning® *Kit* - Invitrogen
- Plasmid Mini kit - Qiagen
- Ampicilin - Zentiva
- Isopropanol - Penta
- Ethanol (70%) - lékárna FNM
- TE pufr (pH8) - lékárna FNM

Nejprve jsme si namnožili požadovanou sekvenci pro HHV-6A a B získanou z DNA vzorků ověřených dle práce Hubáček a kol. (Hubacek, Muzikova aj. 2009) pomocí PCR se specifickými primery HHV-6 A a B (Boutolleau, Duros aj. 2006). Po proběhnutí PCR jsme provedli kontrolu produktu pomocí elektroforézy na agarosovém gelu za přítomnosti ethidium bromidu. Připravili jsme si ligační směs dle rozpisu (Tab. 6) pracovali jsme na ledu.

Tab. 6 Ligační reakce

Reagencie	Objem
PCR voda	5µl
Ligační pufr 10x	1µl
Vektor 25ng/µl	2µl
T4 DNA ligáza	1µl
PCR produkt	2µl

K 50 µl kompetentních buněk TOP 10 E. coli z kitu jsme přidali 2 µl ligační reakce, buňky jsme opatrně promíchali špičkou a pak jsme je nechali 30 minut na ledu. Poté jsme buňky nechali na 30 sekund zahřát na 42°C v suchém bloku, kdy jsme buňky transformovaly po zvýšení prostupnosti cytoplasmatické membrány teplotním šokem. Pak jsme buňky vrátili zpátky na led, přidali jsme 250 µl SOC média (pokojové teploty) a roztok jsme nechali 1 hodinu třepat při 225 RPM a 37°C. Kultivací se zregenerovala cytoplasmatická membrána a kompetentní buňky s integrovaným plazmidem se pomnožily v tekutém mediu s přídavkem ampicilinu (100 µg/l). Na sterilní plotny s agarem ošetřeným X-GAL jsme rozetřeli 200, 50, 10 µl media s namnoženými kompetentními buňkami a v hermeticky uzavřeném sáčku jsme je nechali kultivovat 20h při 37°C. Kultivací na selektivní půdě s přídavkem X-GAL (modrým barvivem reagujícím s ß – galaktozidázou) se získají kolonie, z nichž každá zahrnuje vždy jeden klon bakterií. Modrobílou selekcí se rozliší kompetentní bakterie, které v sobě mají požadovaný plazmid. Pokud je fragment genu pro ß - galaktozidázu (Obr. 8) ležící v oblasti klonovacího místa přerušen inzertem, transformovaná buňka za přítomnosti X-GAL se nezbarví modře. Poté jsme plotny uložili na 2h do lednice, aby se dovyvinula barva kolonií. Bakterie pocházející z bílých kolonií jsme pak pomnožili v tekuté kultivační půdě (Terrific Broth) s ampicilinem (100 mg/l), aby se zamezilo kontaminaci běžně se vyskytujícími bakteriemi (Obr. 8) a následně izolovali plazmid DNA. Do zkumavek s 5-7 ml tekuté kultivační půdy jsme přenesli po jedné bílé kolonii a nechali jsme je kultivovat při 37°C a třepání 250 RPM 15-20h. Plazmidovou DNA jsme následně izolovali Plasmid mini kitem firmy Qiagen, postupovali jsme dle návodu výrobce (Příloha 8).

Počet kopií v mikrolitru extrahované DNA jsme následně stanovili z hmotnostní koncentrace DNA změřené na přístroji Nanodrop 1000 a z molekulární hmotnosti 1 plazmidu podělenou avogadrovou konstantou.

Výpočet hmotnostní koncentrace získané DNA vychází z následujících skutečností:

- Plazmid v Topo kitu je dlouhý 3900 bp, inzert má 166 bází, počet bp plazmidu pak odpovídá 4066 bp.
- Jeden bp =650 D
- 1 mol o délce 4066 bp tedy váží: 4066 bp * 650D = $2{,}6*10^6$g
- 1 molekula váží $2{,}6*10^6$ / $6{,}022*10^{-23}$ g = $4.32*10^{-18}$g
- Koncentraci DNA (g/µl) změřenou na přístroji Nanodrop jsme vynásobili hmotností jedné molekuly vektoru a zjistili jsme počet kopií v 1 µl.

Následně jsme dekadicky doředili kalibrační křivku pro HHV-6A, HHV-6B tak, aby se skládal z pěti bodů z nichž nejvyšší má hodnotu 10^5 a nejnižší 10^1 kopií plazmidu.

5.2 Hybridizace a značení FISH

Působením enzymů Dnázy a DNA-polymerázy s exonukleázovou aktivitou dochází k posunu jednořetězcového zlomu (Nick translace) a k inkorporaci značených nukleotidů do DNA sondy. Dnáza naštěpí jeden řetězec, čímž vytvoří zlom. Na volný 3‘ konec řetězce nasedne polymeráza a syntetizuje tentýž řetězec, do kterého vkládá značené nukleotidy a zároveň ve směru 5‘-3‘ odbourává rozštípnutý řetězec. Sondu připravil pomocí kitu NICK translation reagent kit MUDr. A. Vícha, Ph.D.

Lymfocyty periferní heparinizované krve se kultivací (s přídavkem mitogenu) stimulují k růstu a dělení. Ve chvíli kondenzace chromozomů (ideálně v metafázi) se růst zastaví přidáním kolcemidu, vzorek se poté hypotonizuje a zafixuje. Preparát se z výšky nakape na podložní sklíčko. Po mikroskopické kontrole kvalitních mitóz je takto upravený preparát připravený k hybridizaci.

Jednořetězcové DNA sondy značené fluorochromem (v našem případě rhodamidin pro červené spektrum a fluorescein isothiokyanát – FITC pro zelené spektrum) se naváže na templátovou DNA na základě komplementárního párování. Po denaturaci za zvýšené teploty se DNA rozvolní a po následujícím ochlazení se sonda hybridizuje na vyšetřovaný úsek chromozomu.

5.2.1 Příprava nosičové DNA pro výrobu sondy

Z pracoviště Centers for Disease Control and Prevention (CDC) v Atlantě školitel získal kompetentní *E. coli* s šesti zaklonovanými plazmidy se sekvencemi HHV-6: pH6Z-102, pH6Z-108, pH6Z-204, pH6Z-205, pH6Z-802, pH6Z-816 (Lindquester, Inoue aj. 1996),

které jsme izolovali Qiagen Plasmid Maxi Kitem, postupovali jsme dle návodu výrobce (Příloha 8).

5.2.2 Příprava sklíček s metafazickými jádry

Chemikálie:

- LymphoGrow medium - CytoGen
- Kolcemid - BioTech
- KCl (0,075 M) - lékárna FNM
- Methanol - Penta
- Kyselina octová - Penta

Kultivovali jsme lymfocyty za přítomnosti Phytohemagglutininu (PHA). Postupovali jsme dle návodu a doporučení výrobce (Příloha 8).

Hypotonizovaný, zafixovaný roztok jsme nakapali na namražené sklo a nechali oschnout. Pod mikroskopem jsme zkontrolovali „čitelnost“ metafazických jader. Pokud chromozomy nebyly vhodné pro hybridizaci se sondou, suspenzi jsme zředili, nebo jsme ji nakapávali na podložní sklíčko z různé výšky, dokud na něm nebyly mikroskopicky dobře viditelné, zřetelné kondenzované chromozomy.

5.2.3 Hybridizace

Chemikálie:

- Cot-1-DNA - Invitrogen
- Acetát sodný (NaAc) - lékárna FNM
- Etanol (96 % -100 %) - Penta
- Fyziologický roztok citrátu sodného (SSC) - lékárna FNM
- Formamid (pH 7) - Penta
- Dextran sulfát - EastPort

K 50 µl sondy jsme přidali 10 µl Cot-1-DNA (lidská repetitivní DNA, která zabraňuje nespecifickému navázání sondy při FISH) a dále jsme přidali 5 µl objemu 3M NaAc a 150 µl ledového 96 % EtOH, zkumavku jsme vložili na 30 min do mrazicího boxu na -70°C. Pak jsme zkumavku stočili 30 min při 4°C a 12 000 otáčkách. Po slití supernatantu jsme izolovanou DNA nechali sušit na vzduchu. DNA jsme pak rozpustili v 5 µl deionizovaného formamidu, pak jsme přidali 5 µl dextranu sulfátu v 4x SSC. Pak jsme sondu denaturovali 5 minut při 90°C. Mezitím jsme denaturovali chromozomální

preparáty. Podložní sklíčka jsme odvodnili v alkoholové řadě 70 %, 80 %, 96 % etanolem po 2 minutách lázně jsme je uložili do termostatu při 37°C. Sklíčka jsme pak denaturovali (4 ml 20×SSC, 8 ml H_2O, 28 ml formamid), při 73°C / 2 minuty. Znovu jsme sklíčka odvodnili v alkoholové řadě 70 %, 80 %, 96 % etanolem po 2 minutách. Pak jsme nechali etanol odpařit na vzduchu při pokojové teplotě. Na ledu jsme reakci nakapali na sklo, přiložili a zalepili krycí sklíčko, hybridizovali jsme při teplotě 37°C dva dny. Poté jsme odmyli nenavázanou sondu:

- 4 minuty v odmývacím roztoku I (0,5xSSC)
- 2 minuty v odmývacím roztoku II (2xSSC)

Opláchli jsme sklíčko v destilované vodě a nechali ho ve tmě oschnout. Před analýzou jsme na sklíčko přidali kapku (10 µl) DAPI a přitiskli krycí sklíčko. Odečtení výsledků a samotnou analýzu provedl MUDr. A. Vícha, Ph.D. Lokalizace próby určujeme pomocí karyotypovacího systému MetaSystem, který umožňuje karyotypování mitóz. Vyšetřovali jsme nejméně 10 mitóz.

5.3 Transkripce Ci-HHV-6

K analýze transkriptů je třeba použít DNA komplementární (cDNA) k mediátorové RNA (mRNA). Izolace proběhla hustotním gradientem, kdy sítem projdou menší a nejaderné buňky (granulocyty a erytrocyty) a nad vrstvou fikolu zůstanou lymfocyty a monocyty.

Při fenol-chloroformové extrakci (Chomczynski and Sacchi 1987) zůstávají nukleové kyseliny rozpuštěné ve vodném prostředí, zatímco ostatní složky především proteiny sražené fenolem klesnou pod vodnou fázi. Izoamylalkohol pak zvýší rozpustnost fenolu ve chloroformové fázi, takže po protřepání se fenol rozpustí a na rozhraní fází zůstává bílý prstenec sražených proteinů. Z odebrané vodné fáze se přidáním etanolu vysráží nukleové kyseliny. Dnáza zničí ve frakci veškerou DNA a zůstává jen RNA. Přepisem cDNA podle templátové RNA molekuly se získají kódující sekvence celých genů bez intronů. Pro syntézu jsme využili směs hexanukleotidů – randomizovaných (náhodných) primerů. Samotná syntéza je zprostředkována reverzní transkriptázou, kdy koncové sekvence primerů nasedají na komplementární polyadenylové sekvence na konci každého genu. Vzorky u nichž jsme ověřili výtěžek a kvalitu rRNA, jsme pomocí randomizovaných primerů přepsali do cDNA. Náhodné hexanukleotidové primery jsou schopny se vázat a zahajovat syntézu cDNA na mnoha místech podél celého RNA templátu.

Kvalitu cDNA jsme nejprve prověřili RQ-PCR za pomocí genu pro GAPDH (WHO, 2009) a poté jsme cDNA použili pro ověření možné transkripce virových genů zaintegrovaných v lidských chromozomech.

5.3.1 Izolace mononukleárních buněk hustotním gradientem

Chemikálie:

- Ficoll-Paque REsearch Grade - Pharma Tech
- Fosfátový pufr (PBS) (pH 7,4) - lékárna FNM

Do zkumavek jsme si připravili 5 ml vychlazeného PBS pufru a přidali jsme 5 ml nesrážlivé krve. Roztok jsme důkladně promíchali a převrstvili 6 ml ficollu v předem připravených zkumavkách, ty jsme stáčeli při 4°C a 2200 otáčkách 35 min. Mononukleární buňky jsme opatrně odebrali pasteurovou pipetou a promyli v 5ml PBS. Poté jsme přepočítali výtěžek na přístroji Coulter AcT 5 diff OV a frakci lymfocytů a monocytů jsme alikvotovali do zkumavek po 2 milionech buněk a zamrazili do -80°C.

5.3.2 Izolace RNA z mononukleárních leukocytů

Chemikálie:

- 2-mercaptoetanol - Sigma
- Etanol (96-100%) - Penta
- 2-propanol - Penta
- Fenol - Sigma
- Chloroform - Penta
- NaAcetát - Sigma

Zmrzlou peletu buněk jsme šetrně rozmrazili přidáním 500 µl mercaptoethanolu. Nechali jsme ji inkubovat 5 minut na ledové lázni. Přidali jsme 50 µl NaAcetátu, abychom zamezili působení RNáz při izolaci a uchování vzorku. Poté jsme přidali 455 µl phenolu a 130 µl chloroformisoamylalkoholu (smíchaného v poměru 98+2) a vortexovali jsme do mléčného zakalení. Směs jsme nechali inkubovat 3 minuty na ledu, pak jsme ji ztočili při 2200 otáčkách a 4°C 15 minut. Po 100 µl jsme opakovaně odebrali vodnou fázi tak, abychom ji nezkontaminovali vysráženými proteiny. Ideálně jsme odebrali 500 µl vodné fáze. K odebrané vodné fázi jsme přidali stejný objem isopropanolu. Roztok jsme inkubovali 30 minut v -20 °C, poté jsme ji ztočili při 2200 otáčkách a 4°C 10 minut. Slili jsme supernatant a přidali jsme 1ml 75% etanolu.

Opatrným převracením jsme peletu ode dna odlepili a promyli. Pak jsme zkumavku opět ztočili 2000 otáček 5 minut, slili jsme etanol, zbytek jsme opatrně odtáhli pipetou a na vzduchu jsme nechali peletku vysušit. Asi po 15 minutách jsme ji rozpustili při 55°C ve 25 µl vody.

5.3.3 Ošetření RNA DNázou a ověření její kvality

Chemikálie:

- Turbo DNA-free kit - Applied Biosystems

K 25 µl RNA jsme přidali 5 µl 10x TURBO DNase pufr a 1 µl TURBO DNase. Směs jsme inkubovali 30 min při 37°C. Po inkubaci jsme přidali 5 µl inaktivačního činidla a za občasného promíchání jsme ho nechali působit 5 min při pokojové teplotě. Poté jsme přečištěnou RNA přepipetovali do čisté zkumavky.

K ověření kvality RNA jsme využili elektroforesy na agarosového gelu za přítomnosti ethidium bromidu. rRNA se v elektrickém poli rozdělí na dvě podjednotky 18S a 28S přičemž intenzita bandu 28S by měla mít u neporušené RNA asi dvojnásobnou intenzitu oproti bandu 18S. Pokud se na gelu objevily „šmouhy“ nebo neodpovídalo umístění nebo intenzita bandů běžným standardům, vzorky jsme byli nuceni vyřadit. Zároveň jsme provedli kontrolu výtěžku RNA spektrofometricky na nanodropu.

5.3.4 Přepis RNA do cDNA

- Random hexamers (C118A) - Promega
- ImProm-II Reverse Transcriptase (M314A) - Promega
- ImProm-II 5x Reaction Buffer (M289A) - Promega
- $MgCl_2$ (25mM) - Promega
- dNTP - Sigma
- Nuclease free water - Promega

Připravili jsme si randomizovanou RNA dle doporučení výrobce, tak aby v reakci bylo do 5 µg RNA a 0,5 µg primerů (Tab. 7).

Tab. 7 Randomizovaná RNA

Reagencie	**Standardní množství (µl)**
Voda	1
RNA	4

Reagencie	Standardní množství (µl)
Random. hexamery	1
Celkem	6

Směs jsme nechali inkubovat při 70°C 5 min, pak jsme ji zchladili v ledové tříšti a krátce stočili. Takto upravenou směs jsme přidali k reakční směsi pro reversní transkripci připravenou v poměrech doporučených výrobcem, s výjimkou koncentrací $MgCl_2$ a dNTP. $MgCl_2$ jsme v prvním experimentu přidali do reakce zhruba uprostřed rozmezí koncentrací (1,5 mM – 5 mM) doporučných výrobcem (finální koncentrace 3,3 mM) viz Tab. 8 a v druhém experimentu jsme přidali maximální možné množství $MgCl_2$ podle doporučení výrobce (finální koncentrace 5 mM) viz Tab. 9 V druhém experimentu jsme oproti doporučení výrobce (0,5 mM) rovněž přidali v mírném nadbytku dNTP (finální koncentrace 0,75 mM).

Tab. 8 Poměr reagencií pro první transkripční experiment

Reagencie	µl na reakci
Voda bez nukleáz	1
Im Prom.II 5x buffer	4
$MgCl_2$ (25 mM)	2
dNTP (10mM každý nukleotid)	1
RT transcriptase	1
Randomizovaná RNA	6
Celkem	15

Tab. 9 Poměr reagencií pro druhý transkripční experiment

Reagencie	µl na reakci
Voda bez nukleáz	0
Im Prom.II 5x buffer	4
$MgCl_2$ (25 mM)	2,5
dNTP (10mM každý nukleotid)	1,5
RT transcriptase	1
Randomizovaná RNA	6
Celkem	15

Nechali jsme proběhnout reakci – nasedání primerů při 25°C 5 min a prodlužování řetězce cDNA při 42°C 1 hodinu. Na závěr jsme reakci ukončili inaktivací RT transkriptázy při 70°C 15min.

5.3.5 Ověření cDNA genem pro B2M, BG, ABL, GAPDH

Chemikálie:

- HotStar Taq polymeráza - Qiagen
- Primery a sondy - Metabion international
- dNTP - Sigma
- Injekční voda (mini-plasco) - Braun

Pro ověření správného přepisu jsme použili RQ-PCR se specifickými primery a sondami pro geny pro kódující proteiny: beta 2 microglobulin (B2M) (Tab. 10), beta-glucuronidase (GUSB) (Tab. 11), abelson (ABL) (Tab. 12) (Beillard, Pallisgaard aj. 2003) a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Tab. 13) (WHO, 2009). K ověření jsme použili cDNA 3 zdravých dárců bez Ci-HHV-6 získanou stejně jako vzorky z prvního transkripčního experimentu. Pro RQ-PCR jsme použili stejné chemikálie, ve stejných poměrech (Tab. 3) a stejný teplotní profil (Tab. 5) jako pro eseje HHV-6, HHV-6A a B.

Tab. 10 Primery a próby pro gen B2M

B2M-for	GAGTATGCCTGCCGTGTG	*Beillard a kol., 2003*
B2M-rev	AAATCCAAATGCGGCATCT	*Beillard a kol., 2003*
B2Mprobe	FAM-CCTCCATGATGCTGCTTACATGTCTC-TAMRA	*Beillard a kol., 2003*

Tab. 11 Primery a próby pro gen GUSB

GUSB-for	GAAAATATGTGGTTGGAGAGCTCATT	Beillard a kol., 2003
GUSB-rev	CCGAGTGAAGATCCCCTTTTA	Beillard a kol., 2003
GUSBprobe	VIC-CCAGCACTCTCGTCGGTGACTGTTCA-TAMRA	Beillard a kol., 2003

Tab. 12 Primery a próby pro gen ABL

ABL-for	TGGAGATAACACTCTAAGCATAACTAAAGT	Beillard a kol., 2003
ABL-rev	GATGTAGTTGCTTGGGACCCA	Beillard a kol., 2003
ABLprobe	VIC-CCATTTTTGGTTTGGGCTTCACACCATT-TAMRA	Beillard a kol., 2003

Tab. 13 Primery a próby pro gen GAPDH

GAPDH-for	GAAGGTGAAGGTCGGAGT	WHO, 2009
GAPDH-rev	GAAGATGGTGATGGGATTTC	WHO, 2009
GAPDHprobe	TET-CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC-BHQ1	WHO, 2009

U všech třech vzorků jsme zaznamenali podobnou odezvu a to v případě všech 4 kontrolních genů (hodnoty zaznamenané fluorescence emitovaného záření se pohybovaly od 26. do 29. cyklu).

Pro gen GAPDH jsme připravili kalibrační křivku stejným postupem jako pro HHV-6A a B a ověřili jsme s ním všechny získané cDNA s Ci-HHV-6.

5.3.6 Kvalitativní PCR pro vybrané virové geny

Chemikálie:

- HotStar Taq polymeráza - Qiagen
- 2-Log DNA Ladder (0,1-10 kb) - BioLabs
- ethidium bromid - Invitrogen
- SeaKem LE Agarose - Lonza
- TBE pufr (pH 8, c=5x) - lékárna FNM

Na základě známých sekvencí HHV-6A a B (Human herpesvirus 6A,complete genome, NCBI Reference Sequence: NC_001664.2 s 159322 bp, Human herpesvirus 6B, complete genome, NCBI Reference Sequence: NC_000898.1 se 162114 bp) a na základě znalosti přepisu virové DNA, jsem spolu se školitelem navrhla primery pro různé virové proteiny (Tab. 14) pokrývající celý virový genom. Sekvence primerů a jejich rozložení v rámci virového genomu (Příloha 5).

Tab. 14 Seznam námi proteinů detekovaných v cDNA osob s Ci-HHV-6

Kód genu	**Zkratka proteinu**	**Název (funkce) proteinu**
U3	UL24	protein tegumentu
U12	UL3	transmembránový protein, váže se na G-protein, chemokin
U17	-	protein tegumentu, IEB
U18	UL37	protein obálky, IEB
U19	UL38	regulační protein, IEB
U22	U22	membránový protein
U29	-	podjednotka 1 kapsidového triplexu (váže k sobě hexony a pentony)
U30	UL37	protein tegumentu
U31	-	velký protein tegumentu s proteázovou aktivitou

Kód genu	Zkratka proteinu	Název (funkce) proteinu
U38	-	katalytická podjednotka DNA polymerázy
U39	-	glykoprotein-B
U42	-	transaktivátor (zapojen do mRNA sestřihu, transportu atd.)
U43	-	podjednotka primáz-helikázového komplexu
U48	-	glykoprotein-H
U51	UL78	transmembránový protein, váže se na G-protein, chemokin
U54	pp65	protein tegumentu
U57	-	hlavní kapsidový protein
U64	UL17	tegumentový protein asociovaný s kapsidou
U73	-	helikáza vázající se k počátku replikace
U74	-	podjednotka primáz-helikázového komplexu
U75	UL7	protein tegumentu
U77	-	podjednotka primáz-helikázového komplexu
U82	-	glykoprotein-L
U83	pU83	chemokin
U86	-	IE2 (regulační protein s transkripčními faktory)
U94	pU94	(protein zapojený do integrace genomu/latence)
U95	pU95	(protein zapojený do ustanovení latence)
U100	-	glykoprotein-Q

Všechny reakce proběhly na 1,5% agarosovém gelu za přítomnosti ethidium bromidu v prostředí elektrolytického pufru, při konstantním proudu 500 mA a napětí 120V, 30- 35 min. Použitý žebříček měl výslednou koncentraci 50 ng/l. Nejprve jsme ověřili senzitivitu primerů na genomické DNA zdravých dárců pozitivních na Ci-HHV-6A a B, teplotním gradientem a prověřením nejnižší možné koncentrace virové DNA ve vzorku, tak aby byla citlivá na PCR při optimální nasedací teplotě.

V prvním experimentu jsme otestovali cDNA zdravých dárců a pacientů s maligním onemocněním pozitivních na Ci-HHV-6A a B. PCR proběhlo při optimální nasedací teplotě v rámci teplotního profilu vhodného pro použitou polymerázu (Tab. 16) rozpis reagencií (Tab. 15) primery jsme pipetovali do reakce tak, abychom každý gen stanovili v duplikátu.

Tab. 15 Rozpis reagencií pro kvalitativní PCR pro detekci cDNA virových proteinů

Reagencie	**µl na reakci**	**Finální koncentrace**
PCR voda	8,115	
pufr 10x+$MgCl_2$(15 mM)	1,5	1x+1,5 mM
$MgCl_2$(25 mM)	0,6	1 mM
Glycerol 50%	1,5	5%
dNTP (5mM)	0,3	100 µM
cDNA	2	*
HotMaster poly 5U/ul	0,06	0,02 U/µl

*koncentrace kontrolního genu u použitých cDNA se pohybovala v rozmezí 10^3 – 10^5 kopií.

Tab. 16 Teplotní profil pro kvalitativní PCR pro detekci cDNA virových proteinů

DENATURACE	95°C	15:00
AMPLIFIKACE -cykly: 45x	94°C	0:15
	58°C	0:30
	72°C	1:00

V druhém experimentu jsme stanovili jen několik vybraných virových proteinů v cDNA přepsané za zvýhodněných podmínek u 1 zdravého dárce pozitivního na HHV-6A. K PCR jsme použili reagencie v takovém poměru (Tab. 17), který zvýhodňuje průběh PCR a jako teplotní profil jsme použili touch-down PCR (Tab. 18), tato modifikace PCR zlepšuje senzitivitu PCR.

Tab. 17 Rozpis reagencií pro kvalitativní PCR pro detekci cDNA virových proteinů s přídavkem $MgCl_2$

Reagencie	**µl na reakci**	**Finální koncentrace**
PCR voda	7,715	
pufr 10x+$MgCl_2$(15 mM)	1,5	1x+1,5 mM
$MgCl_2$(25 mM)	1	1,7 mM
Glycerol 50%	1,5	5%
dNTP (5mM)	0,3	100 µM
cDNA	2	*
HotMaster poly 5U/ul	0,06	0,02 U/µl

*koncentrace kontrolního genu u použitých cDNA se pohybovala v rozmezí 10^3 – 10^5 kopií.

Tab. 18 Teplotní profil touch-down pro kvalitativní PCR pro detekci cDNA virových proteinů

DENATURACE	95°C	15:00
AMPLIFIKACE -cykly: 5x	94°C	0:15
	60°C	0:30
	72°C	0:45
AMPLIFIKACE -cykly: 5x	94°C	0:15
	58°C	0:30
	72°C	0:45
AMPLIFIKACE -cykly: 50x	94°C	0:15
	55°C	0:30
	72°C	0:45
Dosyntetizování - 1x	72°C	10:00

6 Charakteristika pacientů a kontrolního souboru

Vzhledem k možným interakcím virových proteinů s buněčným mechanismy a tím možné transformaci buňky spojené se zhoubným bujením jsme se rozhodli pro srovnávací studii výskytu Ci-HHV-6 ve skupině pacientů s maligním onemocněním a kontrolní skupinou dárců nevykazující žádná onemocnění.

6.1 Pacienti

V průběhu řešení projektu IGA č. NS9907, na kterém jsem se v rámci řešení své diplomové práce podílela, jsme testovali na přítomnost HHV-6 DNA vzorky od celkem 230 dětských pacientů s maligním onemocněním léčených na Klinice dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FN Motol. Celkem jsme prospektivně získali vzorky od 102 dětských pacientů s leukémiemi, 9 pacientů s myelodysplastickým syndromem, 61 pacientů s lymfomy a 58 pacientů s jiným maligním onemocněním. Zároveň jsme získali vzorky od 345 dospělých pacientů léčených na Ústavu hematologie a krevní transfúze, kde byli léčeni: 82 pro akutní lymfoblastickou leukemii (ALL), 141 pacientů pro akutní myeloidní leukemii (AML), 48 pacientů pro myelodysplastický syndrom (MDS) a 74 pacientů pro jiná proliferativní onemocnění. Do kalkulací byly rovněž zahrnuty vzorky od 220 dospělých a 17 dětských pacientů testovaných na přítomnost HHV-6 grantu NR/9166-3, léčených pro Hodgkinův lymfom. Celkem jsme tedy v letech 2006 – 2011 testovali při screeningu přítomnost HHV-6 vzorcích DNA z krve u 812 pacientů s maligním onemocněním, kompletní seznam maligních onemocnění diagnostikovaných u pacientů

zahrnutých do studie (Příloha 6).Vyšetřili jsme 565 dětských a 247 dospělých pacientů s maligním onemocněním.

6.2 Kontrolní skupina

Testovali jsme 420 vzorků DNA z nehtů u zdravých nepříbuzných dárců. Jednalo se o 143 žen a 277 mužů, 367 dospělých a 53 osob mladších 18 let. Nehty jsme sbírali v letech 2008-2010 a to převážně z řad studentů a jejich kamarádů, kolegů z laboratoře, žáků/rodičů plavecké školy Betynka a v neposlední řadě také v kosmetickém salonu při manikúře. Abychom usnadnili sběr genetického materiálu od dárců jsme požadovali jen informaci o pohlaví, kontakt a podepsaný informovaný souhlas (Příloha 7). U osob mladších 18 let informovaný souhlas podepsal alespoň jeden rodič. Celkem jsme vyšetřili 369 zdravých dárců, kteří byli starší 18 let a 53 zdravých dárců mladších 18 let.

6.3 Statistické zhodnocení výsledků

Pomocí chí-kvadrátu jsme otestovali případy a kontroly, tedy zda se od sebe dvě skupiny ve zkoumaném jevu (tedy v přítomnosti Ci-HHV-6) významně liší. Potřebujeme k tomu kontingenční tabulku, která vyžaduje 4 čísla: počet nemocných se zkoumaným jevem (pacienti s maligním onemocněním a Ci-HHV-6), počet nemocných bez zkoumaného jevu (pacienti s maligním onemocněním bez Ci-HHV-6), počet zdravých kontrol se zkoumaným jevem (zdraví s Ci-HHV-6), počet zdravých kontrol bez zkoumaného jevu (zdraví bez Ci-HHV-6).

Pro chí-kvadrát test potřebujeme ještě jednu tabulku s hodnotami, které by platily v případě, že platí nulová hypotéza, tzn. že mezi jevem a nemocí není žádný vztah - tyto hodnoty se jmenují očekávané. Očekávanou hodnotou by tak byla průměrná hodnota, kterou bychom získali při dlouho opakovaném měření. Očekávané hodnoty se vypočítají z původní tabulky jako součet řádků krát součet sloupců děleno celkovým součtem (E). Porovnáním se skutečnou hodnotou (O), zjistíme chí kvadrát (χ^2).

$$E = \frac{součet\ řádků\ x\ součet\ sloupců}{celkový\ součet}$$

$$\chi^2 = \sum \frac{(O-E)^2}{O}$$

Pak jsme porovnali skutečné a očekávané hodnoty a zhodnotily na hladině významnosti 5 %. Pomocí softwaru MS Excel jsem získala hodnotu P. Když je kalkulované p nižší než 0,05, pak se testované skupiny ve zkoumaném jevu statisticky významně liší.

7 Výsledky

7.1 Srovnání četnosti výskytu Ci-HHV6 ve zdravé populaci a u pacientů s maligní m onemocněním

U všech pozitivních vzorků byl poměr lidské a virové DNA přibližně 1:1. Testovali jsme 420 zdravých osob, z nichž 4 bylo Ci-HHV-6 pozitivních. Tudíž výskyt Ci-HHV-6 ve zdravé skupině činil 0,95 %.

Tab. 19 Charakteristika Ci-HHV-6 pozitvních ze skupiny zdravých dárců

VĚK	POHLAVÍ	TYP VIRU
>18	ž	B
>18	ž	A
<18	m	B
>18	ž	B

HHV-6 DNA jsme detekovali u 86 pacientů s maligním onemocněním. Z této skupiny jsme vytipovali 9 pacientů s vysokou virovou náloží (medián 9383 NVCs) a potvrdili jsme u nich Ci-HHV-6 z ústřižků nehtů. Virová DNA byla v poměru k lidské přibližně 1:1. Pacientů s maligním onemocněním bylo testováno 812 z toho 9 Ci-HHV-6 pozitivních. Výskyt Ci-HHV-6 u skupiny s maligním onemocněním je 1,11 %.

Tab. 20 Charakteristika Ci-HHV-6 pozitivních ze skupiny pacientů s maligním onemocněním

DIAGNOZA*	VĚK	POHLAVÍ	TYP VIRU
C81.1- Hodgkinův lymfom – nodulární skleróza	27,8	m	A
C81.1- Hodgkinův lymfom – nodulární skleróza	25,8	ž	B
C81.1- Hodgkinův lymfom – nodulární skleróza	20,4	m	A
C91.0- Akutní lymfoblastická leukémie	10,6	m	A
C81.9- Hodgkinův lymfom nespecifikovaný	14,5	ž	A
C92.0- Akutní myeloidní leukémie	57,6	m	B

DIAGNOZA*	VĚK	POHLAVÍ	TYP VIRU
C40.2- maligní nádor dlouhých kostí dolní končetiny – Ewingův sarkom/PNET	12,1	m	A
C91.0- Akutní lymfoblastická leukémie	22,4	ž	A
C92.0- Akutní myeloidní leukémie	62,5	ž	A

*Rozdělení diagnóz u pacientů dle Mezinárodní klasifikace nemocí.

Frekvenci výskytu Ci-HHV-6 ve skupině s maligním onemocněním oproti zdravým dárcům jsme statisticky testovali chí kvadrát testem. Srovnáním s očekávaními hodnotami a za předpokladu nulové hypotézy při stupni volnosti 1 a hladině významnosti p=0,05 jsme zjistili p=0,8, čímž jsme potvrdili nulovou hypotézu: mezi pacienty s maligním onemocněním a zdravými kontrolami není statisticky významný rozdíl v distribuci Ci-HHV-6. V naší studii jsme celkem vyšetřili 1232 vzorků, zachytili jsme 13 probandů pozitivních na Ci-HHV-6. Námi zjištěná celková frekvence Ci-HHV-6 v populaci tedy činí 1,1% s poměrem A : B variant 8:5.

7.2 Rodinné studie

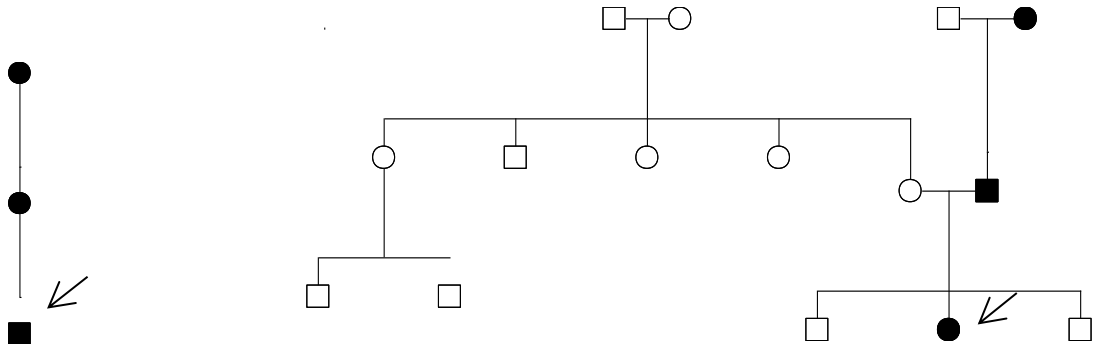
Od čtyř rodin z obou skupin jsme získali genetický materiál k potvrzení vertikálního přenosu Ci-HHV-6 pomocí metody RQ-PCR a sestavení rodokmenů. U rodinných příslušníků s pozitivním výsledkem byl potvrzen stejný typ viru HHV-6.

Ze skupiny pacientů s maligním onemocněním jsme získali nehty od 3 rodin, vyextrahovali jsme z nich DNA a metodou RQ-PCR jsme u dvou rodin (Obr. 10) potvrdili dědičnost ve dvou generacích. U třetí rodiny jsme získali nehty jen jednoho z rodičů probanda (rodokmen zde není uveden), v jeho genomu nebyl HHV-6 integrován. Dědičnost jsme proto nemohli ani vyvrátit ani potvrdit.

Rodina 1 Rodina 2

Obr. 10 Rodokmeny Ci-HHV-6 pozitivních pacientů s maligním onemocněním

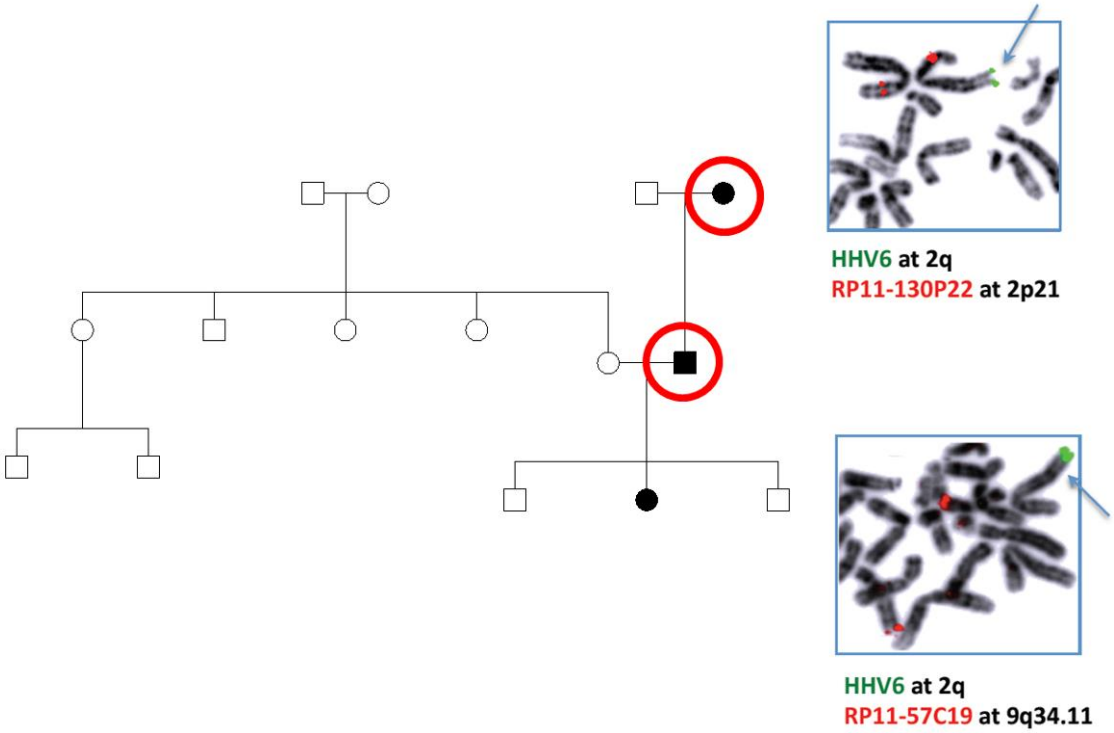
Ze skupiny zdravých dárců jsme získali nehty pro analýzu a sestavení 2 rodokmenů (Obr. ***11***) a potvrdili jsme dědičnost ve třech generacích.



Rodina 1 Rodina 2

Obr. 11 Rodokmeny Ci-HHV-6 pozitivních zdravých dárců

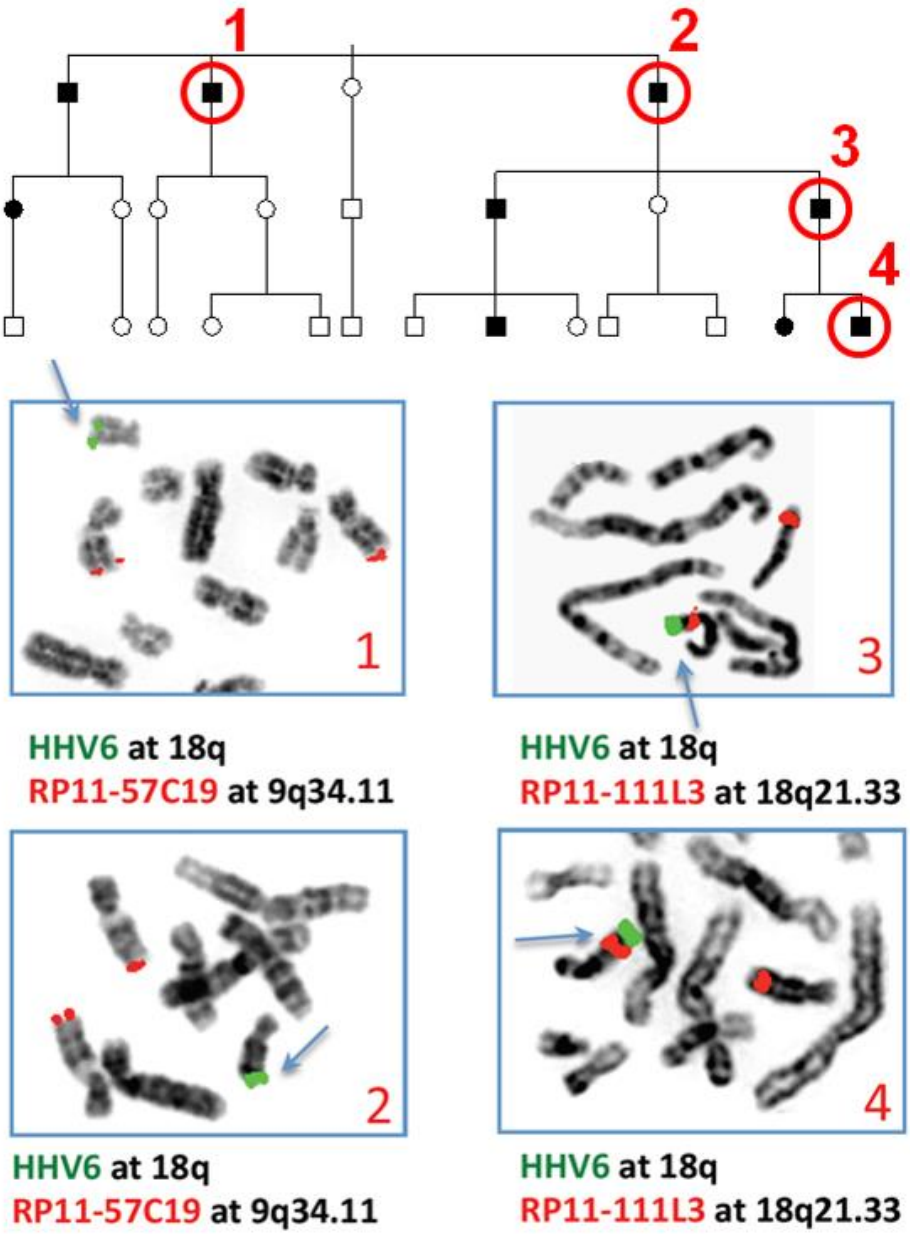
U dvou rodin zdravých dárců jsme získali materiál pro určení dědičnosti metodou FISH. V případě první rodiny se nám podařilo u dvou ze tří Ci-HHV-6 pozitivních nalézt místo integrace. Stejné vzorky zpracovali v cytogenetické laboratoři UCL (University College London) zavedenou metodou pro lokalizaci Ci-HHV-6 a potvrdili virovou integraci v subtelomerické oblasti chromozomu 2 na jeho dlouhém ramínku (2q) a to u všech členů rodiny s Ci-HHV-6 (Obr. 12).



Obr. 12 FISH - rodina 2 ze skupiny zdravých dárců

Zeleně (FITC) je značené místo integrace, červeně (Rhodamin) kontrolní lokus-specifická sonda.

U další rodiny pacienta s Ci-HHV-6 náhodně zachyceného při rutinním vyšetřování herpetických virů v ÚLM se nám podařilo lokalizovat chromozomální integraci u čtyř z devíti členů rodiny s Ci-HHV-6. Stejné vzorky rovněž verifikovali v cytogenetické laboratoři UCL (University College London) a potvrdili Ci-HHV-6 v subtelomerické oblasti chromozomu 18 na jeho dlouhém ramínku (18q) a to u všech členů rodiny s Ci-HHV-6 (Obr. 13).



Obr. 13 FISH - rodina 3 ze skupiny zdravých dárců

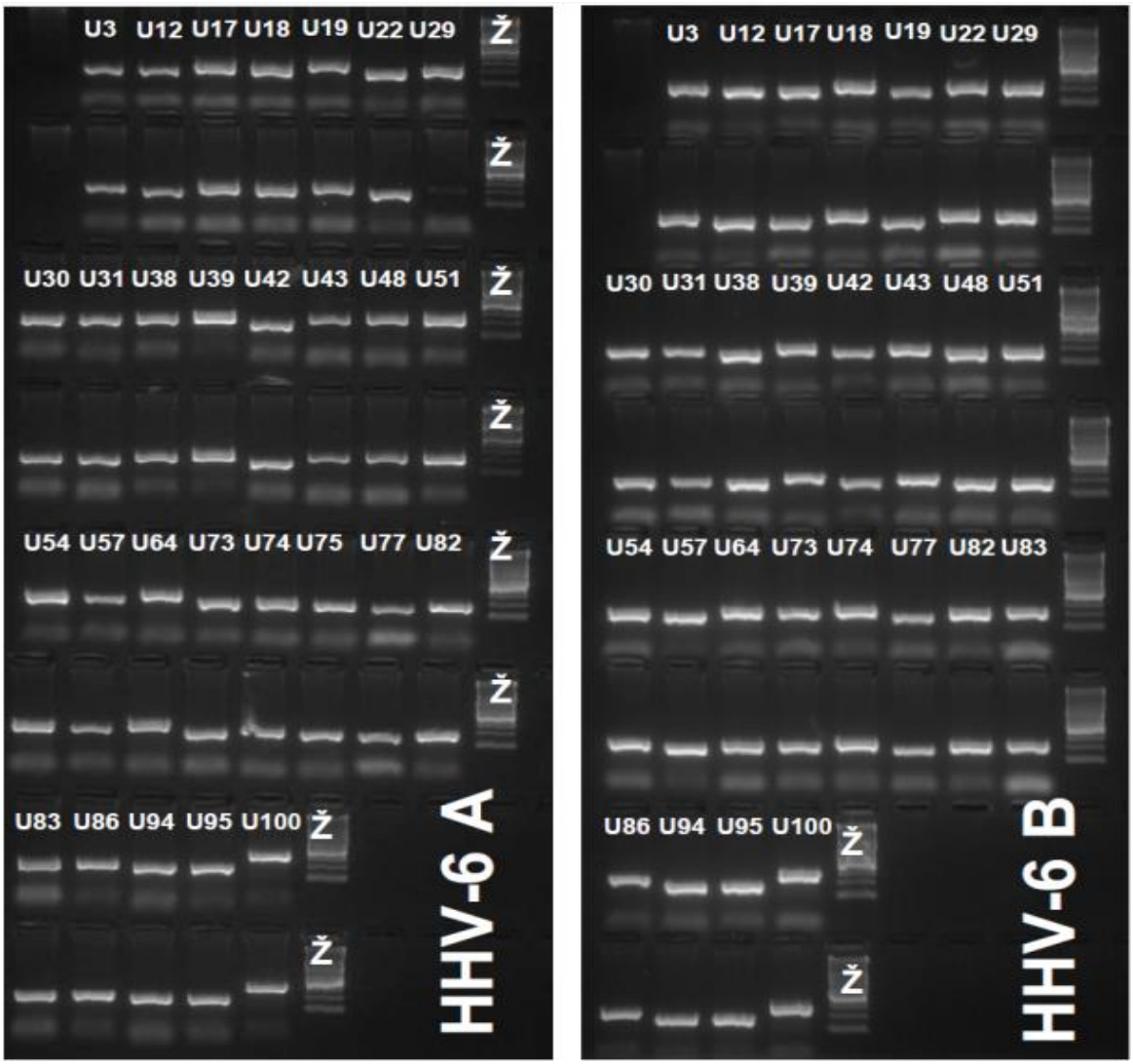
Zeleně (FITC) je značené místo integrace, červeně (Rhodamin) kontrolní lokus specifická sonda.

Metodu FISH pro identifikaci Ci-HHV-6A a B MUDr. A. Vícha stále optimalizuje, neboť detekce zatím není tak spolehlivá, jak bychom chtěli.

7.3 Virová transkripce Ci-HHV-6

Získali jsme 10 PBMC na Ci-HHV-6 pozitivních vzorků od pacientů s maligním onemocněním a od zdravých osob a jejich rodinných příslušníků z kontrolního souboru. Z nich jsme extrahovali RNA pro přepis do cDNA.

Nejprve jsme ověřili senzitivitu primerů na různých koncentracích genomické DNA pozitivních na Ci-HHV-6. Spolehlivé signály jsme zaznamenali už při 10 kopiích viru/µl (**Obr.** ***14***).

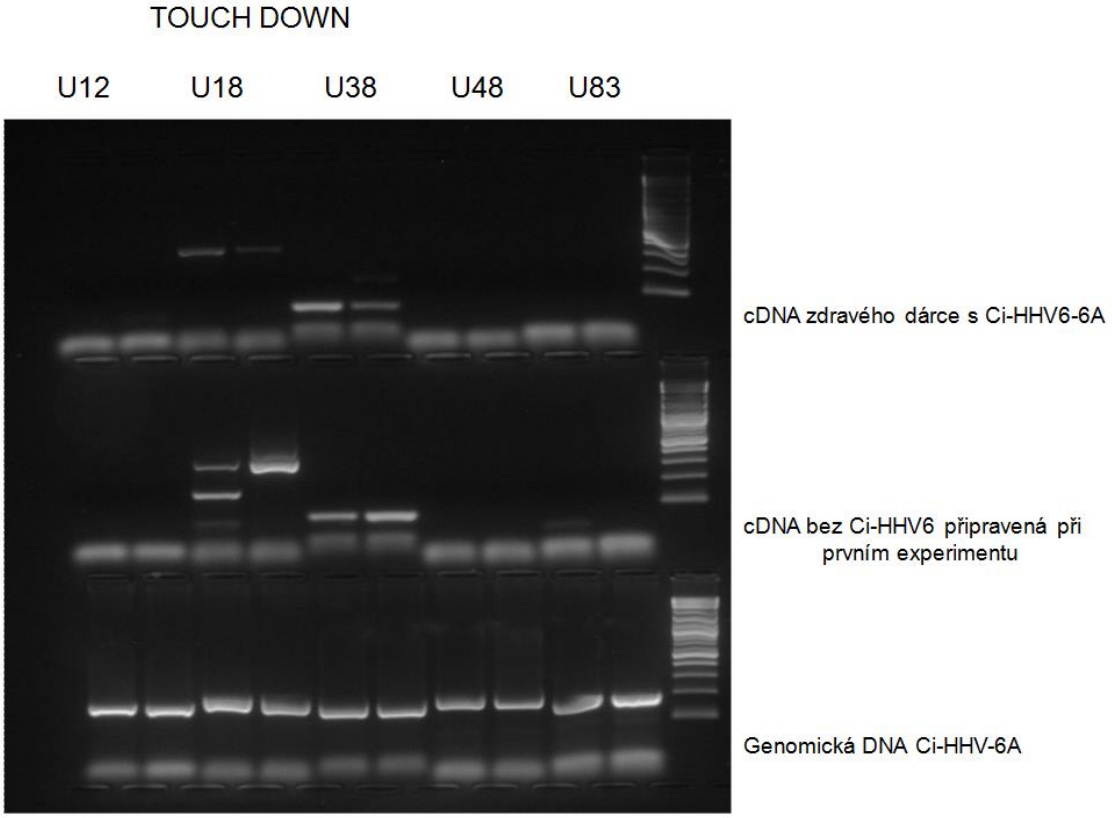


Obr. 14 Ověření senzitivity primerů na genomické DNA zdravých dárců pozitivních na Ci-HHV-6

Těmito primery jsme otestovali cDNA (přepis ověřený RQ-PCR pro GAPDH) 5 pacientů s maligním onemocněním a 9 zdravých dárců a jejich rodinných příslušníků (výsledky

nejsou vyobrazeny). U žádného testovaného vzorku jsme nezaznamenali specifický přepis podle daných primerů. Podezření na nespecifický přepis jsme vyloučili sekvenováním.

V dalším experimentu jsme ověřovali možný přepis vybraných virových proteinů (Obr. 15) z cDNA získané za zvýhodněných podmínek a senzitivnější metodou PCR. Opět jsme nezaznamenali specifický přepis. Nespecifické signály jsme sekvenováním identifikovali v aplikaci BLAST jako 45 S RNA ribozomální podjednotku, mRNA myeloperoxidázu a další buněčné RNA.



Obr. 15 Touch-down PCR zdravého dárce s Ci-HHV-6A

8 Diskuze

Z dosud publikovaných dat je naše studie druhá největší v Evropě (viz kapitola 8.1). Zatím nikdo nepublikoval data získaná zároveň ze skupiny zdravých dárců a z definované skupiny pacientů. Díky zpětné vazbě na testované jedince jsme mohli epidemiologickou studii rozvést a dále pokračovat v experimentech tak, abychom přispěli k osvětlení biologických souvislostí Ci-HHV-6.

8.1 Frekvence výskytu Ci-HHV-6A a B, zdraví vs nemocní

Největší studie byla provedena v USA a to s využitím pupečníkové krve. Testováno bylo 5638 osob, přičemž frekvence Ci-HHV-6 v této studii činila 0,85 % (Hall, Caserta aj. 2008). V USA v roce 2008 bylo testováno 100 dobrovolných dárců krve s frekvencí 1 % Ci-HHV-6 (Hudnall, Chen aj. 2008), obě studie byly provedeny podobnými metodami jako naše práce a rovněž Ci-HHV-6 byla podobně odvozena (vysoká hladina NK specifických pro HHV-6). Pokud tyto data shrneme, bylo testováno 5738 zdravých osob s frekvencí 0,85 % Ci-HHV-6. Další 3 studie z USA byly provedeny u pacientů po orgánových transplantacích a po HSCT. Tyto výsledky publikované v roce 2011 byly detekovány u pacientů po transplantaci, celkem bylo testováno 917 pacientů s frekvencí 1,5 % Ci-HHV-6 (Lee, Brown aj. 2011; Zerr, Fann aj. 2011). Ve Velké Británii byla provedena studie četnosti výskytu Ci-HHV-6 u 500 dobrovolných dárců krve a byla zjištěna frekvence 0,8 % (Leong, Tuke aj. 2007). V rámci Velké Británie a Irska pak byla provedena také serologická studie u dětí léčených pro encefalitidu a zároveň na sérech zdravých dětí z anonymní serologické banky. Byla zaznamenána zvýšená frekvence protilátek u nemocných dětí (Ward, Thiruchelvam aj. 2005). Informace získané ze serologické analýzy ale bohužel nemají výpovědní hodnotu pro rozpoznání Ci-HHV-6. V roce 2007 byla stejnými autory provedena nová studie u 510 pacientů (převážně dětí) s encefalitidou, tentokrát provedená metodou PCR na DNA získané z krve a séra pacientů. Ci-HHV-6 pak byla definovaná vysokou hladinou nalezených virových nukleových kyselin (v séru > 3,5e10 kopií/ml a v krvi > 6e10 kopií/ml), frekvence Ci-HHV-6 činila 1,6 % (Ward, Leong aj. 2007). V Itálii byla provedena v roce 1995 v návaznosti na nově objevený fenomén Ci-HHV-6 studie u 150 pacientů s HL, Non Hodgkinovskými lymfomy (NHL) a roztroušenou sklerózou (MS). HHV-6 byla zjištěna u 6 pacientů z toho u 3 byla potvrzena restrikční analýzou přítomnost celého virového genomu v PBMC. U těchto 3 pacientů byla dále potvrzena chromozomální integrace metodou FISH. Frekvence Ci-HHV-6 u těchto

pacientů byla 2 % (Torelli, Barozzi aj. 1995). V další studii provedené v Itálii v roce 2009 byla potvrzena pomocí PCR získané z vlasových folikulů a stejná frekvence Ci-HHV-6 jako ve studii z roku 1995(2 %) u 205 pacientů po transplantaci solidních orgánů a po alogenní HSCT (Potenza, Barozzi aj. 2009).

V Japonsku byla provedena studie u 2332 zdravých dobrovolníků. Pro Ci-HHV-6 svědčili vysoké hladiny nukleových kyselin specifických k HHV-6 opakovaně zaznamenané v PBMC u 5 dobrovolníků. Integrace byla potvrzena pomocí PCR z různých somatických buněk těchto dobrovolníků a jejich rodinných příslušníků. U 2 rodin byla rovněž potvrzena Ci-HHV-6 pomocí FISH. Celková frekvence Ci-HHV-6 ve zdravé Japonské populaci tedy činí 0,21 % (Tanaka-Taya, Sashihara aj. 2004). V našich publikacích kde jsme v letech 1997-2011 testovali 1151 pacientů s maligním onemocněním, u nichž jsme zjistili frekvenci 1,3 % Ci-HHV-6 (Hubacek, Hrdlickova aj. 2012; Hubacek, Muzikova aj. 2009).

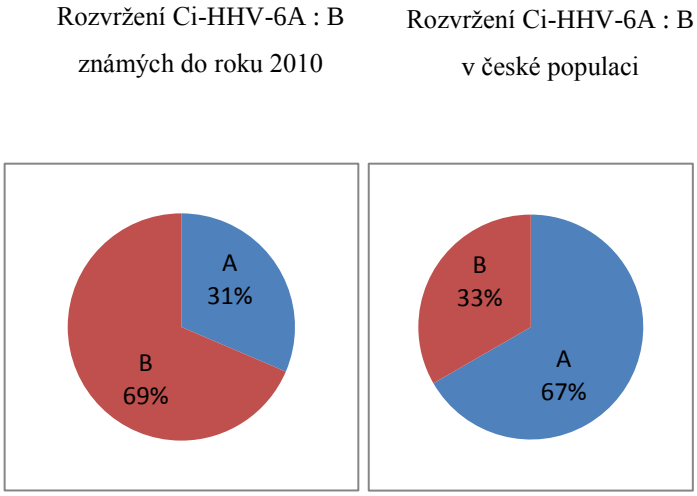
Tab. 21 Shrnutí frekvencí Ci-HHV-6 publikovaných v letech 1995-2011

Stát	**Definice testovaných(é) skupin(y)**	**Počet testovaných**	**Frekvence (%) testovaných**	**Publikováno**
USA	Zdraví	5738	0,9	2011
USA	Pacienti po transplantaci	917	1,5	2011
VB	Zdraví	500	0,8	2005
VB	Pacienti s encefalitidou	510	1,6	2007
Itálie	Pacienti s HD, NHL, MS a po HSCT	355	2,0	1995 a 2009
Japonsko	Zdraví	2332	0,2	2004
ČR	Zdraví	420	0,95	2012
ČR	Pacienti s maligním onemocněním	1151	1,22	2009 a 2012

Pokud tedy srovnáme naše výsledky s výsledky publikovanými dříve (Tab. 21), prevalence u zdravých dobrovolníků i u nemocných odpovídá přibližně námi zjištěným hodnotám.

V dosud publikovaných studiích bylo popsáno podrobněji 105 případů integrací, z toho připadá 33 případů na Ci-HHV-6A a 72 případů na Ci-HHV-6B (Morissette and Flamand 2010). V České republice jsme v našich studiích publikovali 18 případů Ci-HHV-6 v poměru 12 Ci-HHV-6A : 6 Ci-HHV-6B. Tedy obrácený poměr oproti součtu všech případů integrací. Ještě markantněji tento rozdíl vynikne, pokud rozlišíme skupinu maligních pacientů v poměru 11 Ci-HHV-6A : 3 Ci-HHV-6B od skupiny zdravých dárců, kde je poměr variant A : B ve shodě s publikovanými případy v západní Evropě. Rozdíl frekvence variant Ci-HHV-6 v obou námi testovaných skupinách, nás vedl k úvahám o

možném vlivu dědičnosti Ci-HHV-6A v romské menšině (Hubacek, Hrdlickova aj. 2013). K podobným výsledkům rozvržení variant integrovaného viru jako u naší skupiny pacientů s maligním onemocněním totiž dospěli i v Maďarsku (Csoma, Meszaros aj. 2011), kde je výskyt romské menšiny obdobný jako v České republice.



Obr. 16 Rozvržení Ci-HHV-6A : B

8.2 Integrace HHV-6 do stejných míst v lidském genomu

Přestože byly zaznamenány integrace HHV-6 do různých oblastí lidského genomu, do některých míst (22q13, 17p13.3) se integruje častěji. Je možné, že heterochromatinové struktury na některých chromozomech mohou být přístupnější homologní rekombinaci mezi virovými a chromozomálními repeticemi, a nebo se HHV-6 náhodně integruje do všech 92 telomerických oblastí na konci chromozomů. Ovšem pokud Ci-HHV-6 kóduje sekvence destabilizují proteiny Sheltrinova komplexu, může to vést k destabilizaci celého chromozomu, buněčného genomu a také k buněčné apoptóze. Negativní selekcí tak projdou jen některé chromozomy nebo jen určitá „stabilní“ místa pro virovou integraci (Arbuckle, Medveczky aj. 2010).

Tab. 22 Místa a frekvence Ci-HHV-6

Počet případů	Místo Ci-HHV-6	
2	1q44	(Arbuckle, Medveczky aj.2010; Watanabe, Daibata aj. 2008)
2	9q34.3	(Ward, Leong aj. 2006; Nacheva, Ward aj. 2008)
1	10q26.3	(Nacheva, Ward aj. 2008)
1	11p15.5	(Nacheva, Ward aj. 2008)
7	17p13.3	(Arbuckle, Medveczky aj. 2010; Luppi, Marasca aj. 1993; Morris, Luppi aj. 1999; Clark, Nacheva aj. 2006; Nacheva, Ward aj. 2008)

Počet případů	Místo Ci-HHV-6	
1	18p11.3	(Hubacek, Virgili aj. 2009)
1	18q23	(Arbuckle, Medveczky aj.2010)
1	19q13.4	(Ward, Leong aj. 2006; Nacheva, Ward aj. 2008)
4	22q13a22q-tel	(Arbuckle, Medveczky aj.2010; Tanaka-Taya, Sashihara aj. 2004)

Rovněž byl popsán zvláštní případ integrace, kdy nositel zdědil od každého rodiče jiné místo integrace (1q44 a 22q13) (Daibata, Taguchi aj. 1999).

K již popsaným místům integrace jsme přidali další dvě místa, kam je virus schopný se v lidském genomu integrovat (18q, 2q) ve shodě s již publikovanými daty se i námi nalezená místa integrace nachází v telomerických oblastech chromozomů.

8.3 Transkripce virových proteinů Ci-HHV-6

Při našich experimentech se nám oproti publikovaným datům (Clark, Tsao aj. 2006), kdy byly v krvi zdravého jedince s potvrzeným Ci-HHV-6 opakovaně nalezeny virové transkripty (U11, U14, U27, U31, U38, U39, U51, U69, U83, U90, U91, U94) nepodařilo detekovat přepsané virové proteiny. Při optimalizaci metod nám chyběl skutečný model viru. Opakovaně jsme se pokoušeli dle publikovaných dat získat HHV-6A a HHV-6B infikované buňky pěstované na buněčných kulturách a z nich následně přepisované mRNA. V tom jsme bohužel nebyli úspěšní. V experimentech jsme tedy byli odkázaní jen na cDNA získanou ze vzorků pacientů a zdravých kontrol s Ci-HHV-6 a nemohli jsme tedy ve větší míře optimalizovat a ověřit detekci virové mRNA. Do budoucna by bylo třeba otestovat různé transkripční systémy, vyzkoušet přepis se specifickými primery, eventuelně se zaměřit na zvýšení senzitivity navržením externích a interních primerů. Dosud se nám tedy nepodařilo ani potvrdit ani přesvědčivě vyvrátit hypotézu o možném přepisu proteinů integrovaného viru na našich vzorcích.

9 Závěr

Ve studii, která je podkladem této diplomové práce, jsme se věnovali výskytu Ci-HHV-6 ve zdravé populaci a u pacientů s maligním onemocněním. Dále jsme zavedli nové metodiky, které můžou přispět k osvětlení biologických souvislostí vyplývajících z dosud nepříliš prozkoumané integrace virového genomu do lidského chromozomu. Pro správně vedenou terapii při zachycení vysoké pozitivity HHV-6 je zásadní rozlišit virovou reaktivaci či primoinfekci od Ci-HHV-6. Díky prezentaci naší práce na mezinárodních konferenci: European Congress of Mikrobiology and Infection diseases (ECCMID) 2012 (Příloha 4) a našim publikacím: **Prevalence of chromosomally integrated HHV-6 in patients with malignant disease and healthy donors in the Czech Republic** (Příloha 1) v časopise *Folia Microbiologica* **(**impact factor: 0,791) a **Chromozomalní integrace šestého lidského herpesviru (HHV-6) (**Příloha 2) v časopise *Epidemiologie, Mikrobiologie, Imunologie* seznamujeme odbornou veřejnost s tímto fenoménem a osvětlením výkladu výstupů z molekulárně biologické detekce přispíváme ke správné interpretaci výsledků a z nich vyvozených závěrů.

U skupiny pacientů ve srovnání s kontrolní skupinou jsme nezaznamenali signifikantní rozdíl ve frekvenci Ci-HHV-6. Nepřímo jsme tedy potvrdili, že Ci-HHV-6 nemá vliv na propuknutí maligní choroby. Díky zpětné vazbě na testované jedince jsme mohli provést rodinné studie, kdy jsme potvrdili dědičnost Ci-HHV-6 ve třech generacích.

Vzhledem k novému pojetí rozdělení lidských herpetických virů, kdy jsou dvě varianty viru HHV-6A a HHV-6B v odborné veřejnosti stále více chápány jako dva samostatné druhy, zavedli jsme k již fungujícím esejím, které odhalují herpetické infekce u pacientů FNM, další dvě plně kompatibilní eseje, které rozlišují tyto dva viry.

Pod vedením MUDr. A. Víchy, Ph.D. se nám podařilo zavést, byť zatím ne zcela optimální, metodiku FISH detekce místa integrace do lidského genomu a aplikovat ji při testování rodinných příslušníků zachycených Ci-HHV-6. Díky této metodě se nám podařilo odhalit další dvě nová místa virové chromozomální integrace.

10 Přílohy

Seznam příloh:

- Příloha 1 - Článek 1

Prevalence of chromosomally integrated HHV-6 in patients with malignant disease and healthy donors in the Czech Republic

- Příloha 2- Článek 2

Chromozomalní integrace šestého lidského herpesviru (HHV-6)

- Příloha 3- Článek 3

Prevalence of HHV-6 Integrated Chromosomally Among Children Treated for Acute Lymphoblastic or Myeloid Leukemia in the Czech Republic

- Příloha 4 - Poster

Chromosomally integrated HHV-6 in healthy donor and patients treated for haematological malignancy

- Příloha 5 - Sekvence primerů pro reverzní transkripci
- Příloha 6 - Soupis onemocnění ve skupině pacientů s maligním onemocněním
- Příloha 7 - Informovaný souhlas
- Příloha 8 - Návody

10.1 Příloha 1 – Článek 1

Author's personal copy

Folia Microbiol
DOI 10.1007/s12223-012-0180-z

Prevalence of chromosomally integrated HHV-6 in patients with malignant disease and healthy donors in the Czech Republic

Petr Hubacek · Alena Hrdlickova · Martin Spacek · Miroslav Zajac · Katerina Muzikova · Petr Sedlacek · Petr Cetkovsky

Received: 28 February 2012 / Accepted: 25 June 2012
© Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i. 2012

Introduction

Chromosomal integration of human herpesvirus 6 (Ci-HHV-6) was described first in 1993 by Luppi et al. (1993). Despite increasing number of studies concerning the clinical impact of HHV-6 A and HHV-6 B viral species (former known as HHV-6 variants; Ablashi et al. 2012) or directly Ci-HHV-6, biological consequence of Ci-HHV-6 is yet not fully understood (Pellett et al. 2012). Classical horizontal infection of HHV-6 is transmittable from one person to another leading to subsequent latent viral infection of the host in a form of episomic viral DNA in the cells and the possibility of viral reactivation into the infection with production of infectious viral capsids (Flamand et al. 2010). Such type of HHV-6 primary infection and latency is similar to other human herpesviruses (Ward 2005). In the situation of Ci-HHV-6, viral DNA is integrated directly into the human chromosomes and is inherited through the germ line from parents to child vertically (Pellett et al. 2012). It is the reason for presence of HHV-6 DNA is in every cell of the body which leads to the ratio of human and viral DNA 1:1 and to the possibility of Ci-HHV-6 confirmation by detection of HHV-6 DNA in the nails or hair roots (Pellett et al. 2012). Despite both HHV-6 species can be chromosomally integrated, inheritance of viral DNA in vivo is unique among the human herpesviruses.

So far published data locate the integrated HHV-6 DNA into the telomeric part of the chromosomes suggesting possible association of Ci-HHV-6 with development of the malignant proliferation due to the impact of the telomerase and shortening of the telomers into the regulation of cell proliferation (Pellett et al. 2012; Morissette and Flamand 2010; Martinez and Blasco 2011). Published studies with the patients having primary malignant disease show rather wide range of Ci-HHV-6 prevalence from 0.74 to 12.73 % (Pellett et al. 2012). In our previous study among 339 children treated for acute leukaemia, we detected Ci-HHV-6 prevalence of 1.47 % (Hubacek et al. 2009). Hence we were interested in the more detailed calculation of the Ci-HHV-6 prevalence in Czech patients with malignant disease and in general population.

P. Hubacek (✉) · A. Hrdlickova · K. Muzikova · P. Sedlacek
Department of Paediatric Haematology and Oncology, 2nd Faculty of Medicine of Charles University and Motol University Hospital, V Uvalu 84,
Prague 5 CZ 150 06, Czech Republic
e-mail: petr.hubacek@lfmotol.cuni.cz

M. Spacek
Department of Clinical Haematology, 3rd Faculty of Medicine of Charles University and University Hospital Kralovske Vinohrady, Prague, Czech Republic

P. Hubacek · M. Zajac
Department of Medical Microbiology, Motol University Hospital, Prague, Czech Republic

P. Cetkovsky
Institute of Haematology and Blood Transfusion,
U nemocnice 1,
Prague, Czech Republic

Materials and methods

Between the year 2007 and 2012, we collected prospectively samples from 220 adult and 47 paediatric patients treated for Hodgkin lymphoma, 345 adult patients treated for leukaemias and myelodysplastic syndrome (MDS) and 200 children treated for malignant disease (111 leukaemias and MDS, 89 other solid tumours) at the time of diagnosis. To calculate the prevalence of Ci-HHV-6 in the general population, we asked students, sportsmen and customers of the cosmetic salons to donate the nail clippings to test the

Author's personal copy

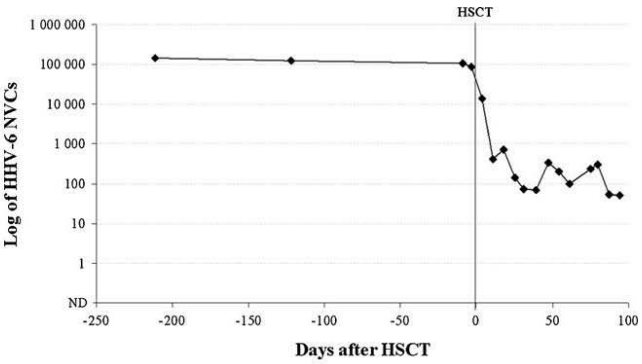


Fig. 1 Detection of HHV-6 DNA in the pre- and post-transplant samples from the Ci-HHV-6-positive patient with AML. *ND* not detected, *NVCs* normalised viral copies, *HSCT* haematopoietic stem cell transplant

presence of HHV-6. We collected 421 samples of nail clippings from 143 men and 278 women (368 adults and 53 children).

We obtained at least one sample of whole peripheral blood from every patient at the time of diagnosis and one sample of nail clippings from the voluntary donors. DNA from the samples was extracted according to the manufacturers' instruction using Qiagen DNA Blood Mini kit (whole blood) and Qiagen DNA Micro Kit respectively (nail clippings). Presence of HHV-6 was tested by RQ-PCR in the same way as in our previous studies same as albumin gene quantity to omit the possibility of false-negative results (Hubacek et al. 2009). HHV-6 DNA load was normalised to 100,000 human genome equivalents and expressed in normalised viral copies (NVCs).

In case of HHV-6 positivity in nail clippings, we tried to get blood sample from the individual to confirm the Ci-HHV-6 by detection of high HHV-6 DNA levels in the blood, same as to identify the relatives with the Ci-HHV-6 by the detection of HHV-6 DNA in nails and subsequently whole blood. In the Ci-HHV-6-positive individuals, HHV-6 A and B were identified using previously published approach (Boutolleau et al. 2006).

The study was approved by local ethics committee and informed consent for such testing was signed by tested persons, or by their guardians. Results were tested using basic statistical methods.

Results and discussion

During the prospective surveillance, we tested 812 patients treated for malignant disease. HHV-6 DNA was detected in 86 obtained screening blood samples. High HHV-6 DNA positivity was detected in nine samples from three children and six adults (median 93,827 NVCs; range 27,530 271,064 NVCs), while in the rest of the patients, we detected lower HHV-6 DNA levels (median 12.9 NVCs; range 1.1 1,430 NVCs). Low-level HHV-6 DNA positivity was observed in 51 children and 26 adults.

In all nine patients with high HHV-6 DNA positivity, we subsequently confirmed Ci-HHV-6 by detection of HHV-6 DNA in the nails (median 59,636 NVCs; range 35,789 130,133 NVCs). In seven of them, we detected HHV-6 A, while in the rest HHV-6 B. During the surveillance two patients with acute myeloid leukaemia (AML) deceased due to progression of the primary disease, one underwent allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) for AML and the rest of the patients with Ci-HHV-6 successfully finished the chemotherapy and is at the remission of the malignant disease.

From seven patients with Ci-HHV-6, we collected additional 41 peripheral whole blood samples. The median of detected quantity in the samples obtained from the individuals without/before HSCT was 59,676 NVCs (range 10,199 271,064 NVCs). After the HSCT, we detected similar

Table 1 Results and their statistical significance calculated by chi-square test in the compared groups

	Patients with malignant disease, *n* (%)	Healthy donors of nail clippings, *n* (%)	Statistical significance (*p* value)
No. of tested individuals	812 (100)	421 (100)	
Positive individuals	86 (10.1)	5 (1.19)	
Ci-HHV-6	9 (1.11)	5 (1.19)	0.76, N.S.
HHV-6 A	7 (0.86)	1 (0.24)	0.20, N.S.
HHV-6 B	2 (0.24)	3 (0.71)	0.22, N.S.
Ratio of HHV-6 A and HHV-6 B	7/2	1/3	0.07, N.S.

N.S. not significant

Author's personal copy

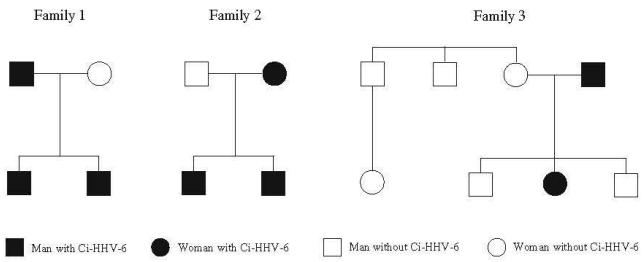


Fig. 2 Detection of HHV-6 DNA in the nail clipping samples within the three patient families showing the inheritance of Ci-HHV-6. Patients in family 1 and 2 were treated for Hodgkin lymphoma, patient from family 3 for acute myeloid leukaemia

decrease (see Fig. 1) of the HHV-6 DNA as in our previous case with the median of HHV-6 quantity of 140.7 NVCs (range 47–84,000 NVCs). Because the patient has integrated HHV-6 A, we also tested presence of HHV-6 B in the post-transplant samples; HHV-6 B was not detected. We did not observe clinical symptoms attributable to HHV-6 infection in any of the patients.

Together with our previously identified Ci-HHV-6 individuals among 339 children treated for leukaemia (Hubacek et al. 2009), we tested 1,151 patients and identified 14 cases of Ci-HHV-6 (7+4 with HHV-6 A and 2+1 with HHV-6 B) which means the prevalence of 1.22 % in the cohort of patients with malignant disease. Among the healthy donors, we identified four cases of Ci-HHV-6 (one with HHV-6 A and three with HHV-6 B) representing the prevalence of 0.95 %. HHV-6 DNA was detected with median of 93,773 NVCs (range 42,007–100,000 NVCs) in their nail clipping samples. Detected prevalence is not statistically different between tested cohorts both in prevalence and detection of HHV-6 species (see Table 1).

In case of confirmed Ci-HHV-6, we asked the individuals to collect nails from their family and obtained 35 samples of nail clippings from family members. Among them, we detected additional nine individuals with Ci-HHV-6 and confirmed the inheritance through the generations in the tested families (see Fig. 2).

Conversely to the more frequent detection of Ci-HHV-6 B in the published studies (Hall et al. 2010; Pellett et al. 2012), we observed more often integrated HHV-6 A. Only in one study from Hungary, the HHV-6 A outnumbered the individuals with HHV-6 B (Csoma et al. 2011). Therefore, we analysed basic characteristics of the presented individuals with Ci-HHV-6 more closely and found that four of the identified individuals with Ci-HHV-6 A are members and another one has a father coming from one minority in the Czech Republic. Despite the small numbers, such observation leads us to the hypothesis that related marriages in this rather closed community might be responsible for higher frequency of Ci-HHV-6 A. Interestingly, people from this community are at the similar percentage present also in the Hungary, same as in the Central and Eastern Europe (e.g. Slovakia) and are rather rare in the Western Europe and USA. Our observation might therefore suggest presence of such people in the studies from our area as the reason for higher frequency of Ci-HHV-6 A. More frequent detection of integrated HHV-6 B among the healthy volunteers representing majority population also shows the importance of selection bias in similar studies, because people from the mentioned minority did not participate on voluntary donation of nail clippings.

The observed prevalence of the Ci-HHV-6 individuals is very similar in both tested groups and is in agreement with the previously described prevalence among the blood donors both in the UK and USA (0.8 and 1.0 %, respectively; Pellett et al. 2012). Despite further studies testing the characteristics and impact of Ci-HHV-6 in more individuals that are needed to statistically significant evidence, our observation suggests no impact of the Ci-HHV-6 on the incidence of the malignant disease within the Czech population and higher frequency of detection of chromosomally integrated HHV-6 A in genetically related individuals.

Funding The work is supported by grant of Ministry of Health of the Czech Republic NS-9907.

References

Ablashi D, Diluca D, Pellett PE (2012) Recognition of human herpesvirus 6 variants A and B as distinct herpesvirus species. 8th International Committee on Taxonomy of Viruses—update, vol 2012

Boutolleau D, Duros C, Bonnafous P, Caiola D, Karras A, Castro ND, Ouachee M, Narcy P, Gueudin M, Agut H, Gautheret-Dejean A (2006) 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 35(3):257–263

Csoma E, Meszaros B, Gall T, Asztalos L, Konya J, Gergely L (2011) Dominance of variant A in human herpesvirus 6 viraemia after renal transplantation. Virol J 8:403

Flamand L, Komaroff AL, Arbuckle JH, Medveczky PG, Ablashi DV (2010) Review, part 1: Human herpesvirus-6-basic biology, diagnostic testing, and antiviral efficacy. J Med Virol 82(9):1560–1568

Hall CB, Caserta MT, Schnabel KC, Shelley LM, Carnahan JA, Marino AS, Yoo C, Lofthus GK (2010) Transplacental congenital human herpesvirus 6 infection caused by maternal chromosomally integrated virus. J Infect Dis 201(4):505–507

Author's personal copy

Hubacek P, Muzikova K, Hrdlickova A, Cinek O, Hyncicova K, Hrstkova H, Sedlacek P, Stary J (2009) Prevalence of HHV-6 integrated chromosomally among children treated for acute lymphoblastic or myeloid leukemia in the Czech Republic. J Med Virol 81(2):258–263

Luppi M, Marasca R, Barozzi P, Ferrari S, Ceccherini-Nelli L, Batoni G, Merelli E, Torelli G (1993) Three cases of human herpesvirus-6 latent infection: integration of viral genome in peripheral blood mononuclear cell DNA. J Med Virol 40(1):44–52

Martinez P, Blasco MA (2011) Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins. Nat Rev Cancer 11 (3):161–176

Morissette G, Flamand L (2010) Herpesviruses and chromosomal integration. J Virol 84(23):12100–12109

Pellett PE, Ablashi DV, Ambros PF, Agut H, Caserta MT, Descamps V, Flamand L, Agnes G-D, Hall CB, Kamble RT, Kuehl U, Lassner D, Lautenschlager I, Loomis KS, Luppi M, Lusso P, Medveczky PG, Montoya JG, Mori Y, Ogata M, Pritchett JC, Rogez S, Seto E, Ward KN, Yoshikawa T, Razonable RR (2012) Chromosomally integrated human herpesvirus 6: questions and answers. Rev Med Virol 22(3):144–155

Ward KN (2005) The natural history and laboratory diagnosis of human herpesviruses-6 and -7 infections in the immunocompetent. J Clin Virol 32(3):183–193

10.2 Příloha 2 – Článek 2

Epidemiol. Mikrobiol. Imunol. 61, 2012, č. 3, s. x–xx

Chromozomální integrace šestého lidského herpesviru (HHV-6)

Hubáček Petr[1, 2], Alena Hrdličková[2], Miroslav Zajac[1]

[1]Ústav lékařské mikrobiologie 2. lékařské fakulty UK a Fakultní nemocnice v Motole
[2]Klinika dětské hematologie a onkologie 2. lékařské fakulty UK a Fakultní nemocnice v Motole

SOUHRN

Do komplexu šestého lidského herpesviru (Human herpesvirus – 6; HHV-6) jsou řazeny dva blízce příbuzné a v populaci běžně se vyskytující viry HHV-6 A a HHV-6 B. Primoinfekce HHV-6 probíhá většinou již v časném dětském věku, a to jak asymptomaticky, tak u HHV-6 B také ve formě šesté exantémové nemoci. Po primoinfekci zůstává HHV-6 v organismu přítomen v latentní formě, s možností virových reaktivací. Článek popisuje v odborné veřejnosti méně známý fenomén chromozomální integrace HHV-6 (Ci-HHV-6), který se v běžné populaci vyskytuje s frekvencí přibližně 1% a který je na rozdíl od běžně se šířící infekce dědičný a bez dosud známého patologického dopadu na nosiče této integrované HHV-6 DNA. I proto je znalost klinických souvislostí přítomnosti Ci-HHV-6 zásadní pro správně vedenou terapii v situaci vysoké pozitivity při molekulárně-biologické detekci HHV-6.
Klíčová slova: **šestý lidský herpesvirus – molekulární biologie – PCR – chromozom**

SUMMARY

Hubáček Petr, Hrdličková Alena, Zajac Miroslav: Chromosomal Integration of the Sixth Human Herpes Virus (HHV-6)

Two closely related and commonly found human herpesviruses HHV-6 A and HHV-6 B are classified into the sixth human herpes virus complex (HHV-6). Primary infection with HHV-6 often takes place in early childhood and it can be either asymptomatic or manifests itself as sixth disease (caused by HHV-6 B). HHV-6 remains present in a latent form in the body with the potential for virus reactivation. The article points out the phenomenon of chromosomal integration of HHV-6 (Ci-HHV-6) which is found in about 1% of the population and, unlike the commonly spread HHV-6 infection, has become hereditary, with its pathological potential in Ci-HHV-6 DNA carriers remaining unknown. Therefore, the focus on clinical consequences of Ci-HHV-6 is of high relevance to the therapeutic strategy for patients with high HHV-6 positivity in molecular biological tests.
Key words: **sixth human herpesvirus – molecular biology – PCR – chromosome**

ŠESTÝ LIDSKÝ HERPESVIRUS

Šestý lidský herpesvirus, Human herpesvirus 6 (HHV-6), je názvem komplexu dvou velmi blízce příbuzných virů známých jako HHV-6 A a HHV-6 B, dříve popisovaných jako subtypy HHV-6[1]. Oba jsou členy podčeledi ß-herpesviridae, stejně jako jeho příbuzní – lidský cytomegalovirus (CMV) a sedmý lidský herpesvirus (Human herpesvirus 7; HHV-7) [36].

Podobně jako další zástupci lidských herpesvirů po primoinfekci zůstává v latentní formě v organismu hostitele [9]. Tato latentní infekce je umožněna epizomickým setrváním samostatné a oproti lidským chromozomům malé cirkulární formy HHV-6 DNA v jádře. Z této, v jádře přítomné latentní, formy DNA je pak HHV-6 schopen se v určitých situacích reaktivovat a zároveň modulovat chování imunitního systému směrem, který zvýhodňuje jeho přežití či pomnožení [9]. Také proto byl prvně popsán jako HBLV (Human B Lymphotrofic Virus – Lidský B lymfotropní virus) u imunosuprimovaných pacientů včetně HIV pozitivních v laboratoři dr. Roberta C. Gala v roce 1986 [17].

Morfologicky je HHV-6 obalený virus s ikosahedrální strukturou kapsidy a genomem, který tvoří dvouřetězcová molekula DNA o velikosti 160, respektive 162 kilobazí a velikostí maturovaného infekčního virionu přibližně 200 nm [9]. Shoda genetické informace HHV-6 A a HHV-6 B

na úrovni DNA sekvence je více než 90% [9, 36]. HHV-6 A i HHV-6 B jsou především T lymfotropní, a to i přesto, že byl HHV-6 původně popsán jako B lymfotropní virus [39].

Buněčným receptorem pro HHV-6 je jeden z regulačních proteinů komplementové kaskády – CD46[9]. Díky tomu, že se tato molekula vyskytuje i na dalších buňkách organismu, je HHV-6 schopný infikovat in vitro také další buňky, jako jsou monocyty/makrofágy, NK buňky, fibroblasty, astrocyty, oligodendroglie, mikroglie, buněčné linie jaterních buněk, epiteliální a endoteliální buňky. In vivo jsou pak u HHV-6 popsány infekce mozkové tkáně, jater, tonzil, slinných žláz, endotelií a kostní dřeně [9].

Stejně jako u dalších herpesvirů, umožňuje obsáhlost genomu HHV-6 nést značné množství genů včetně genů modulujících imunitní odpověď hostitele. Z dosud popsaných 66 genů HHV-6 se známou či předpokládanou funkcí [39], se jedná např. o virové homology chemokinů, jako je kupříkladu produkt genu U83. Tento protein funguje jako vysoce účinný chemokin s vazbou na CCR2 (chemokinový receptor 2, CD192), který při svém výskytu v prostředí přitahuje do místa výskytu HHV-6 buňky monocyto-makrofágového systému. Infikování těchto buněk pak umožňuje snazší šíření HHV-6 infekce v organismu hostitele. Z dalších vlivů HHV-6 pak můžeme zmínit například zvýšení produkce INF-@ v napadených buňkách a naopak snížení produkce INF-@, aktivujícího imunitní odpověď. Obdobným způsobem moduluje HHV-6 imunitní odpověď pomocí napadených buněk monocyto-makrofágového systému, kdy zvyšuje v buňkách produkci IL-10 a snižuje produkci IL-12. Tato modulace pak vede k potlačení cytotoxické a zvýšení protilátkové odpovědi imunitního systému tak, aby nedošlo ke zničení napadených buněk. Tyto a mnoho dalších mechanismů zapojených do modulace chování jednotlivých buněk i celkových imunitních reakcí pak ukazují na komplexnost pochodů při infekci HHV-6 [9]. Proteinový aparát viru zároveň umožňuje HHV-6 latentní setrvávání v organismu a jeho reaktivace při stresu, či imunosupresivním stavu v organismu [9].

HHV-6 A A HHV-6 B

HHV-6 A a HHV-6 B byly popsány jako subtypy HHV-6 až v roce 1993 po sedmi letech od objevu viru [2]. Přestože jsou, jak již bylo uvedeno, genetické odlišnosti HHV-6 A a HHV-6 B relativně malé, jejich biologické vlastnosti i příznaky infekce (viz níže) se liší. I z těchto důvodů byly podle ICTV (International Committee for Taxonomy of Viruses) oba původní subtypy HHV-6 v updatu 8. vydání mezinárodní virové nomenklatury uznány za dva samostatné virové druhy [1]. Spolu s Herpes simplex virem 1 a 2 a Varicella-Zoster virem (reprezentujícími skupinu lidských @-herpesvirů), svými příbuznými CMV a HHV-7, virem Epstein-Baarové (EBV) a osmým lidským herpesvirem (Human herpesvirus 8; HHV-8) pak jeden z těchto subtypů bude představovat devátý lidský herpesvirus. Aby však nebyly do již existující literatury, věnující se již téměř třicet let zjišťování různých vlastností HHV-6, zanášeny nomenklaturní nejasnosti, budou se i nadále oba viry nazývat svými původními názvy – tedy HHV-6 A a HHV-6 B[1]

EPIDEMIOLOGIE A KLINICKÉ PŘÍZNAKY INFEKCE HHV-6

Z obecného pohledu většina primoinfekcí HHV-6 probíhá asymptopaticky. V případě HHV-6 A se dosud nepodařilo najít a prokázat zcela jasnou kauzalitu infekce s patologickým stavem [36].

Oproti tomu HHV-6 B je dobře znám jako původce šesté dětské nemoci (Roseola infantum, Exanthema subitum). Toto běžné benigní dětské onemocnění je zpravidla příznakem primoinfekce, která se projevuje dvěma dny horeček s náhlým koncem doprovázeným výsevem prchavého exantému. Samotná „náhlá vyrážka“ (Exanthema subitum) pak ustupuje v řádu desítek minut, takže často ani urychleně přivolaný lékař již nemusí kožní projevy u dítěte zastihnout. Primoinfekce se také může projevit jako respirační, nebo průjmové onemocnění bez exantému, případně ve starším věku příznaky infekční mononukleózy (mononukleosa-like syndrom). Vzácněji může infekce HHV-6 B způsobit febrilní křeče, hepatitidu či encefalitidu [38]. Primoinfekce se odehrává v časném dětském věku a přenáší se tělními sekrety, zejména slinami, do nichž se virus ve velkém množství uvolňuje [27]. Ve stáří 2 let je podle studií séropozitivních více než 95 % vyšetřovaných dětí [30, 36].

U imunosuprimovaných pacientů může být infekce či reaktivace HHV-6 asociována s útlumem krvetvorby, častěji a v závažnější formě se však mohou objevit i výše zmíněné komplikace primoinfekce [24]. U pacientů po transplantaci hematopoetických kmenových buněk (Haematopoietic Stem Cell Transplant – HSCT) je pak HHV-6 asociován s pozdějším přihojením štěpu a zejména opožděnou produkcí krevních destiček [24]. Zároveň je známo, že se u těchto pacientů

HHV-6 často reaktivuje v souvislosti s dalšími, zejména herpesvirovými infekcemi[15] a s nemocí štěpu proti hostiteli [35]. Jde-li jen o příznak hloubky imunosupresivního stavu nebo o nějaké aktivní zapojení na základě produkce virových homologů cytokinů a modulace imunitního systému, dosud není zcela objasněno.

DIAGNOSTIKA INFEKCE HHV-6 (B)

V současné době se diagnostika HHV-6 infekce opírá především o klinické hodnocení proběhlého stavu, potvrzeného případně sérologickou detekcí protilátek proti HHV-6 [36]. Sérologická detekce je nicméně významně limitována nedostatkem spolehlivých diagnostických sad založených na principu ELISA, zejména pro detekci protilátek IgM. Detekce protilátek se tak provádí většinou metodou nepřímé imunofluorescence, která je ovlivněná subjektivním hodnocením vyšetřujícího a jeho zkušenostmi. Výpovědní hodnotu sérologických testů také omezuje obtížnost interpretace výsledků u pacientů s latentní infekcí HHV-6 způsobenou zejména zkříženou reaktivitou protilátek proti HHV-6 A, HHV-6 B a HHV-7 u většiny testů, stejně jako možnost zkřížené reaktivity proti dalším protilátkám při povšechné aktivaci imunitního systému. U části pacientů v časném stadiu infekce pak naopak ještě nemusí být IgM protilátky detekovány.

Je-li nutná přímá detekce HHV-6, jako např. u imunosuprimovaných pacientů, u kterých je tvorba protilátek značně omezena, či blokována úplně, je přímá diagnostika založená na molekulárně-biologické detekci nukleových kyselin pomocí PCR, případně kvantitativní real-time PCR (RQ-PCR – real-time quantitative PCR) [36]. Možnost detekce antigenu byla prokázána [34], ale na rozdíl od CMV se u HHV-6 nezačala více využívat.

Kultivace HHV-6 není v běžné laboratorní praxi prováděna pro časovou i technickou náročnost [36].

TERAPIE HHV-6

Léčba HHV-6 infekce zpravidla není nutná a žádné virostatikum není přímo schváleno pro terapii HHV-6. Pokud však závažnost klinických příznaků, zejména ve spojení s nedostatečnou imunitní funkcí hostitelského organismu, vyžaduje virostatickou terapii, je infekce léčena stejně jako infekce příbuzným virem CMV včetně dávkování. Terapie je tedy založena na podávání nukleosidových analogů blokujících virovou DNA polymerázu. K dispozici jsou dvě skupiny virostatik. První, do které patří ganciklovir, jeho perorální prodruh valganciklovir, či případně cidofovir, je plně aktivní po fosforylaci pomocí virové thymidin-kinázy. Druhou skupinu, inhibující přímo virovou polymerázu, pak zastupuje foscarnet. Cidofovir, který je velmi účinným virostatikem s širokým spektrum virostatického působení, je pak kvůli významné toxicitě podáván jen v případě krajní nouze.

Nežádoucí účinky virostatické terapie – suprese funkce kostní dřeně (ganciklovir, valganciklovir) či nefrotoxicita (foscarnet a cidofovir) však mohou vést k závažným komplikacím klinického stavu pacientů, a tak je léčba, zaměřená cíleně pouze na HHV-6, relativně vzácná [24].

CHROMOZOMÁLNÍ INTEGRACE HERPESVIROVÉ DNA

Z obecného pohledu je schopnost integrace herpesvirového genomu do genomu hostitele známá od roku 1991 u ptačího herpesviru způsobujícího Markovu chorobu (Marek's disease) [20]. Tuto infekční nemoc kura domácího popsal v roce 1907 maďarský profesor József Marek jako nervovou paralýzu způsobenou monocytární infiltrací nervové tkáně [26]. Následně pak došlo k průkazu asociace této paralýzy s tvorbou lymfoidních nádorů – lymfomatózou. I proto se ve veterinární medicíně věnuje Markově nemoci drůbeže velká pozornost včetně vakcinační prevence. Zajímavé je, že přestože patří Marek's disease virus (MDV) mezi @-herpesviry (tedy podobně jako lidský HSV a VZV), je stejně jako HHV-6 lymfotropním virem. Rovněž u EBV byla prokázána schopnost chromozomální integrace v nádorových buňkách in vitro i in vivo [25, 26].

CHROMOZOMÁLNÍ INTEGRACE HHV-6

Chromozomální integrace HHV-6 (Ci-HHV-6) byla in vitro poprvé popsána na buněčných liniích Daibatou et al. v roce 1999 [8]. V roce 2004 Tanaka-Taya et al. popsali dědičnost Ci-HHV-6 [32] a v roce 2006 Clark et al. publikovali pozorování přenosu vysoké hladiny HHV-6 DNA při HSCT z dárce na příjemce bez jakýchkoli jasných obtíží asociovaných s HHV-6 u obou zúčastněných osob [6]. Současně se

pomocí fluorescenční in-situ hybridizace (Fluorescent In-Situ Hybridisation – FISH) podařilo prokázat přímo místo integrace v chromozomech dárce. Přestože se celé genomy některých virů integrují do lidského genomu (např. HIV), jedná se v případě HHV-6 mezi lidskými herpesviry o in vivo dosud zřídka popisovanou situaci [26].

Od roku 2006 se chromozomální integraci HHV-6 (Ci-HHV-6) věnuje s ohledem na rozvoj molekulárněbiologické diagnostiky větší pozornost. Důvodem je zejména snadná misinterpretace pozitivního výsledku detekce u vertikálně děděné HHV-6 DNA, s následným dopadem na rozhodování o další léčbě pacienta. V současné době nejsou bohužel známy ještě všechny biologické aspekty a souvislosti Ci-HHV-6[30], přesto bychom v našem článku chtěli shrnout dosud známá fakta o Ci-HHV-6 včetně znalostí o výskytu v České republice.

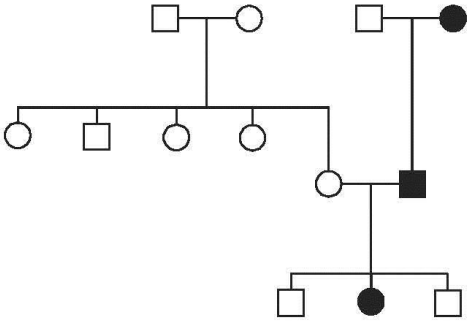
MECHANISMUS INTEGRACE HHV-6

Bohužel, hned na začátek musíme přiznat, že i v tomto bodě zbývá ověřit ještě mnoho faktů, týkajících se zejména vlastního molekulárněbiologického procesu integrace. Dobře známý je nicméně fakt, že HHV-6 se neintegruje pouze na jedno místo v lidském genomu, tedy na jeden chromozom [26, 30]. Až dosud je v literatuře popsáno kolem dvaceti různých míst integrace HHV-6 DNA do lidských chromozomů. Jsou popsány integrace na krátkých i dlouhých raménkách chromozomů 1, 9, 10, 11, 17, 18, 22 [26]. U pacientů popsaných v České republice byla dosud HHV-6 DNA identifikována na dlouhých raménkách chromozomu 2, 18 a 22 [14].

Všechna dosud popsaná místa integrace virové DNA se nacházejí v telomerické a subtelomerické oblasti chromozomů [4, 19, 26, 28]. Jedná se tedy o koncové oblasti chromozomů, na kterých dochází v průběhu dělení buňky ke zkracování a které jsou tak svým zmenšováním jedním z faktorů podílejících se na regulaci buněčného dělení [29]. I z tohoto důvodu je u nádorových buněk popsána aktivita telomerázy, tedy enzymu znovu syntetizujícího tyto úseky [29]. Zda-li má Ci-HHV-6 nějaký vliv na aktivitu tohoto enzymu, a tak na rozvoj maligní buněčné proliferace, není známo. Arbuckle et al. [3] popsali pravděpodobný mechanismus integrace pomocí homologní rekombinace HHV-6 DNA do telomerických oblastí. Děje se tak na základě podobnosti repetitivních terminálních sekvencí virového genomu a sekvencí telomer pomocí virové rekombinázy UL94. UL94 je pak v případě HHV-6 homologní s jinými virovými enzymy účastnícími se integrace virového genomu do genomu hostitelské buňky, jako je rep68/78 u parvoviru AAV-2 [26]. Ačkoli se jejich výsledky dosud nepodařilo potvrdit, činí využití rekombinačních mechanismů a enzymového aparátu buňky a viru toto vysvětlení velmi pravděpodobným [19]. Z rekombinačního mechanismu také vyplývá, že se HHV-6 DNA integruje kompletní, a je tedy otázkou, zda-li by se nemohla z této integrace také uvolňovat zpět do stadia aktivní infekce, provázené tvorbou volných a infekčních virových partikulí.

DĚDIČNOST A FREKVENCE VÝSKYTU Ci-HHV-6

Integrace HHV-6 do zárodečných buněk dobře vysvětluje klasickou Mendelovskou dědičnost Ci-HHV-6 v jednotlivých rodinách [26, 30] – obrázek 1. Tato dědičnost předpokládá výskyt integrované HHV-6 DNA již ve spermii a vajíčku. Zmíněné procesy rekombinace jsou známy svou aktivitou v procesu gametogeneze [31], ačkoli dosud nebyl popsán žádný případ de novo integrace HHV-6 do zárodečných buněk. U všech dosud popsaných případů se tedy jednalo o záchyt jedince, který Ci-HHV-6 již zdědil od svých předků, a tak se HHV-6 DNA vyskytuje ve všech buňkách lidského těla. Také z tohoto důvodu se dá pro důkaz Ci-HHV-6 použít detekce virové DNA ve vlasových folikulech nebo v odstřižcích nehtů metodou PCR [13, 37], tedy bezkrevné tkáni, kde by se herpesvirová DNA neměla vyskytovat ani v případě aktivní proliferace HHV-6 v organismu.



Obr. 1. Záchyt Ci-HHV-6 ve třech generacích jedné z rodin zachycených v ČR
Nositelé Ci-HHV-6 jsou označeni černým vybarvením.

Obr. 1. Záchyt Ci-HHV-6 ve třech generacích jedné z rodin zachycených v ČR
Nositelé Ci-HHV-6 jsou označeni černým vybarvením.

Frekvence výskytu takto děděného HHV-6 je pak popsána mezi 0,2–12,7 % v různých populacích a kohortách pacientů [30, 36] a – pokud sečteme jednotlivé případy – je v současnosti ve světě popsáno přibližně sto rodin, ve kterých se Ci-HHV-6 dědí [30]. Shrneme-li dosud publikovaná data, pohybuje se tedy frekvence výskytu Ci-HHV-6 přibližně kolem 1 % [30].

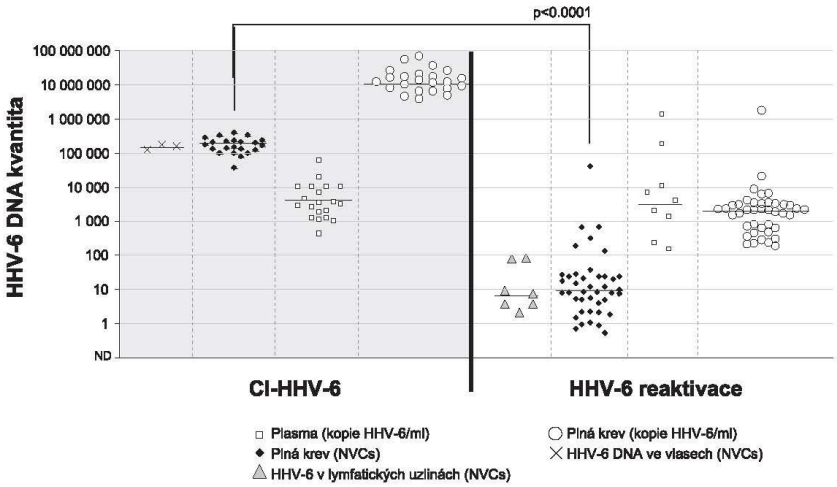
V České republice jsme v retrospektivní studii u dětských pacientů s akutními leukémiemi publikované v roce 2009 prokázali frekvenci výskytu 1,5% [13]. V průběhu následujících let jsme množství testovaných pacientů s hematologickými malignitami rozšířili a frekvenci zpřesnili na 1,3 % a zároveň jsme velmi podobnou frekvenci (1,2 %) zachytili ve vzorcích nehtů zdravých dobrovolníků a náhodně vyšetřených pacientů, především studentů, z české populace [Hubáček et al. článek v recenzním řízení].

DETEKCE Ci-HHV-6

Detekce Ci-HHV-6 se zakládá zejména na prokázání vysoké kvantity HHV-6 DNA v testovaném vzorku. Díky tomu, že se HHV-6 DNA vyskytuje v každé buňce, dá se podle buněčnosti extrahovaného materiálu usuzovat na množství detekované DNA. Obecně by tedy poměr virové a lidské DNA měl být přibližně 1 : 1 [30].

Nejčastějšími testovanými materiály jsou plná krev, plazma a sérum, je proto třeba v první řadě zmínit, že „acelulární" materiály nejsou pro rozlišení aktivní virové infekce a Ci-HHV-6 vhodné [30]. V tomto případě je totiž třeba si jasně uvědomit, že se při detekci jedná nikoliv o buňku, ale pouze o její DNA. Jakákoli újma, která se buňkám v době od odběru do extrahování nukleové kyseliny stane, vede nevyhnutelně k jejich rozpadu a uvolnění lidské DNA (s integrovanou HHV-6) do extracelulárního prostoru. Na rozdíl od aktivní infekce s tvorbou virových partikulí, kde se průkaz virové DNA v tomto prostoru zpravidla považuje za průkaz virémie, je průkaz virové nukleové kyseliny v plazmě a séru u Ci-HHV-6 pouze průkazem volné lidské DNA. Tyto závěry již byly i na mezinárodním fóru několikrát publikovány [16, 37]. Námi získaná data u pacientů s Hodgkinovým lymfomem pak tato pozorování potvrzují (obrázek 2).

Stejně jako u dalších herpesvirů pak při detekci HHV-6 v plné krvi a v izolovaných mononukleárních buňkách narážíme na problém vyjadřování množství virové DNA. V případě vyjádření pozitiv-



Obr. 2. Obrázek rozdílu kvantit HHV-6 v různých materiálech u pacientů s Hodgkinovým lymfomem v případech nosičů Ci-HHV-6 a při běžné reaktivaci
Je vidět jasný rozdíl mezi kvantitou detekovanou v plné periferní krvi u pacientů s Ci-HHV-6 a běžnou reaktivací. Zároveň je jasně dokumentovaná stejná kvantita v plazmě u obou porovnávaných skupin.
NVCs- Normalised Viral Copies – nálož HHV-6 DNA normalizovaná na 100000 lidských genomických ekvivalentů.

Obr. 2. Obrázek rozdílu kvantit HHV-6 v různých materiálech u pacientů s Hodgkinovým lymfomem v případech nosičů Ci-HHV-6 a při běžné reaktivaci
Je vidět jasný rozdíl mezi kvantitou detekovanou v plné periferní krvi u pacientů s Ci-HHV-6 a běžnou reaktivací. Zároveň je jasně dokumentovaná stejná kvantita v plazmě u obou porovnávaných skupin.
NVCs- Normalised Viral Copies – nálož HHV-6 DNA normalizovaná na 100000 lidských genomických ekvivalentů.

ního výsledku na 1 ml plné krve by se o Ci-HHV-6 mělo uvažovat u člověka s normálním krevním obrazem, překročí-li pozitivita 320 000 kopií HHV-6 DNA/ml (tedy 5,5 log HHV-6 DNA/ml) [5, 6, 30]. Je třeba ale vždy mít na paměti, že v tomto případě může být kvantita ovlivněna také možnými inhibitory PCR či kvalitou extrakce a nebrat tuto číselnou hodnotu úplně absolutně. Pokud je výsledek normalizován na počet buněk nebo na lidské genomické ekvivalenty, kvantifikované pomocí některého z lidských genů (např. genu pro albumin, ß-tubulin), pak by měl být zachován stejný poměr virové a lidské DNA – tedy například 200 000 kopií HHV-6 DNA ve 200 000 buňkách, či 10 000 kopií HHV-6 DNA v 10 000 kopiích lidských genomických ekvivalentů [13, 14].

Dopad Ci-HHV-6 na nositele integrace

Jak již bylo výše zmíněno, nebyla zatím in vivo popsána schopnost aktivace HHV-6 DNA z místa integrace zpět do stádia aktivní virové infekce s tvorbou infekčních partikulí. Arbuckle a kol.[3] sice publikovali in vitro studii, při které se pomocí vcelku agresivních virus-aktivujících látek podařilo z kultury buněk nosiče Ci-HHV-6 izolovat infekční partikuli HHV-6, nicméně tato data se dosud nepodařilo potvrdit dalšími vědeckými skupinami (osobní komunikace).

Důkazy o tom, že se chromozomálně integrovaná HHV-6 DNA může přepisovat do mRNA, jsou nicméně publikovány, a tak je velmi pravděpodobné, že by tedy mohlo docházet také k tvorbě některých virových proteinů [7]. S ohledem na velký proteinový aparát, který je obsažen v genomu HHV-6, jehož jednou z hlavních funkcí je modulace funkcí imunitního systému a jeho buněk, je otázkou, nemůže-li se tvorba takových proteinů a jejich uvolňovaní do buňky a jejího okolí podílet na určitých patologických procesech, a negativně se tak zapojovat do klinického vývoje nemoci nositele Ci-HHV-6. I v případě již prokázaných mRNA (U11, U14, U27, U31, U38, U39, U51, U69, U83, U90, U91 a U94[7]) se totiž jedná o geny, zapojené také do těchto imunitních modulací.

Jednou z otázek, která zůstávala nezodpovězená, byla také odpověď nositele Ci-HHV-6 na běžnou primoinfekci HHV-6, lépe řečeno alespoň na HHV-6 B [30]. Víme-li totiž o přepisu některých integrovaných genů do mRNA, jsou z obecného pohledu možné dva základní scénáře reakce osoby s Ci-HHV-6 na HHV-6 infekci. Tím prvním je zvýšená reaktivita imunitního systému, a tak přirozená imunita vůči infekci, protože hypoteticky dochází k opakované prezentaci virových proteinů, a tak k opakované stimulaci imunitních buněk nosiče proteiny HHV-6 [21]. Druhou variantou je pak naopak zvýšená citlivost k běžné infekci HHV-6. Tuto hypotézu podporuje nutnost objevení se virových proteinů v době zrání imunitního systému, kdy jsou procesem pozitivní a negativní selekce selektovány lymfocyty, které jsou schopné nutných interakcí s dalšími buňkami imunitního systému, zejména tedy antigen prezentujícími buňkami, které ale zároveň nereagují vůči vlastním antigenům a nejsou tedy autoimunní[21]. Pokud víme, že dochází k přepisu mRNA a dá se tedy předpokládat, že na jejich základě vznikají virové proteiny a jejich fragmenty prezentované následně na HLA-I, měly by i buňky reagující proti aminokyselinovým sekvencím HHV-6 být negativně selektovány a skončit, jako potenciálně autoimunní, apoptózou [21]. Jak bylo výše uvedeno, detekce Ci-HHV-6 i HHV-6 infekce je založena v současné době především na PCR, a tak je rozlišení primoinfekce na podkladě vysoké nálože DNA velmi obtížné. Z našich dat u imunosuprimovaných pacientů nicméně vyplývá, že v případě Ci-HHV-6 u nositele HHV-6 A, může dojít k infekci i reaktivaci HHV-6 B ve stejné míře, jako je tomu u pacientů bez Ci-HHV-6, a tak tedy muselo v minulosti dojít k primoinfekci HHV-6 B [Hubáček et al. článek v recenzním řízení]. Na úrovni protilátkové odpovědi byla zkřížená reaktivita proti HHV-6 A a HHV-6 B jasně prokázána [33], naše pozorování přesto nepodporují dostatečnou ochranou zkříženou reaktivitu lymfocytů proti blízce příbuzným a sekvenčně velmi obdobným HHV-6 A a B, a tak nepřímo podporují oddělení těchto dvou subtypů do samostatných virových druhů [Hubáček et al. článek v recenzním řízení]. Dosud se nepodařilo získat jasná data vztahující se v případě HHV-6 primoinfekce u nosiče Ci-HHV-6 k humorální imunitní odpovědi [30].

Pokud bychom jako modelovou situaci pro reaktivaci jakékoli latentní virové infekce obsažené v organismu včetně HHV-6 vzali HSCT, můžeme konstatovat, že dosud publikovaná data neposkytují důkaz, že by se integrovaný genom HHV-6 jakkoli podílel na zhoršení prognózy pacienta. Ve všech dosud publikovaných případech, a to jak při přenosu integrované HHV-6 DNA v kmenových buňkách dárce allogenní HSCT [6, 10, 18], tak v případě Ci-HHV-6 u příjemce kmenových buněk od dárce bez integrované HHV-6 DNA [11, 14], nejsou jasné důkazy pro jakéhokoli patogenní působení integrovaného viru. V případě dvou námi publikovaných pacientů pak můžeme nanejvýš spekulovat, zda se na rychlém vývoji rezistence CMV vůči virostatické terapii infekce po HSCT nemohly podílet také proteiny HHV-6, které jsou do jisté míry s proteiny CMV homologní [14, 39].

V případě pacientů po orgánových transplantacích pak Lee et al. pozorovali u pacientů s transplantovanou ledvinou a játry tendenci k mírně horší prognóze v souvislosti s Ci-HHV-6 [22, 23].

ČÍM JE TEDY Ci-HHV-6 KLINICKY DŮLEŽITÉ?

S ohledem na diagnostiku HHV-6 infekce je pro správné hodnocení nálože HHV-6 DNA zásadní mít na zřeteli přítomnost virové DNA ve všech buňkách organismu nebo orgánu u Ci-HHV-6. Z tohoto důvodu totiž může být HHV-6 DNA detekována u pacienta s Ci-HHV-6 i v případě např. enterovirové encefalitidy, kdy ale množství virové DNA bude pouze odrážet množství lidské DNA, a tedy množství enteroviry poškozených a zničených buněk a nikoli nutně podíl HHV-6 na neurologických příznacích. Stejně se pak HHV-6 DNA může objevit i v dalších klinických stavech a materiálech, kde by se jinak virová DNA neměla ve velkých kvantitách standardně nacházet – např. u pneumonie. V těchto případech pak může dojít k misinterpretaci výsledku s následným špatným rozhodnutím ohledně nutnosti použít virostatika a případného dalšího diagnostického a terapeutického postupu [12].

Na druhou stranu v případech vzácné opravdové HHV-6 nemoci, tedy plně symptomatické např. pneumonie s proliferací viru či encefalitidy, nelze tuto virovou infekci přehlížet a je nutno ji začít co nejdříve léčit virostatiky. Nasazení terapie je pak často podpořeno i tím, že se nemoc plně rozvine u imunosuprimovaného pacienta. Rozdíl mezi Ci-HHV-6 a symptomatickou nemocí pak většinou ozřejmí vyšetření hladiny HHV-6 v plné periferní krvi, kdy u pacientů se symptomatickou HHV-6 nemocí nejsou detekované kvantity tak enormní, případně není zachován poměr lidské a virové DNA 1 : 1. Obdobně není možné u symptomatického onemocnění detekovat přítomnost HHV-6 DNA ve vlasových folikulech či nehtech.

JAK POSTUPOVAT V PŘÍPADĚ VYSOKÉ POZITIVITY HHV-6 DNA?

Při interpretaci všech laboratorních výsledků, včetně molekulárněbiologické detekce infekčních agens, je nutné pečlivě přihlížet ke klinickému stavu pacienta. Pokud dojde k detekci pozitivity HHV-6 v biologickém materiálu, kde HHV-6 DNA neměla být detekována (např. mozkomíšní mok či vzorek z bronchoalveolární laváže) a HHV-6 by mohlo být příčinou obtíží, je na místě podle stavu pacienta a detekované kvantity co nejrychlejší potvrzení nebo vyvrácení Ci-HHV-6. To je možno provést minimálně detekcí vysoké kvantity HHV-6 DNA v plné krvi, případně lépe v nehtech. U vysoce rizikových pacientů s podezřením na symptomatickou HHV-6 infekci (např. u pacientů po transplantacích) je vhodné po dobu nutnou pro kompletní laboratorní vyšetření pacienta zajistit virostatiky. Lékem volby je i v tomto případě i. v. ganciklovir, foscarnet nebo p. o. valgancyklovir. Jak bylo výše uvedeno, u hospitalizovaných pacientů je lékem první volby i. v. ganciklovir, především v případě ambulantně léčených pacientů pak p. o. valganciklovir. Pokud se Ci-HHV-6 prokáže, je vysoce nepravděpodobné, že je tato zděděná virová DNA příčinou klinických obtíží a je třeba v diferenciálnědiagnostickém vyšetřování postupovat ke správné diagnóze a virostatika je možno, jsou-li nasazena jen z důvodu zajištění pacienta po dobu laboratorního vyšetřování, vysadit. Pokud se Ci-HHV-6 neprokáže, pak by terapie virostatiky měla pokračovat.

ZÁVĚR

Přestože je fenomén Ci-HHV-6 známý již relativně dlouhou dobu, zůstává s ním spojeno mnoho biologicky i medicínsky zajímavých otázek. Důvodem pomalejšího pokroku je pak zejména malý počet popsaných rodin a pacientů s Ci-HHV-6. Nejdůležitější věcí, vyplývající z dosud známých informací o tomto fenoménu, je však nutnost zahrnutí Ci-HHV-6 do základního klinického uvažování s vazbou na HHV-6 pozitivního pacienta a jeho případnou léčbu a opatrné hodnocení výsledků molekulárně-biologické detekce a případné nasazení terapie virostatiky. Pro formulaci jasných diagnosticko-léčebných guidelines jsou pak nezbytně nutné studie s větším množstvím jak pacientů s různými onemocněními, tak zdravých dobrovolníků.

Podpořeno grantem Interní Grantové agentury Ministerstva Zdravotnictví ČR NS 9907-4.

LITERATURA

1. **Ablashi, D., Diluca, D., Pellett, P. E.** *Recognition of Human herpesvirus 6 variants A and B as distinct herpesvirus species.* 8th International Committee on Taxonomy of Viruses – update, Report No.: 2011.005a-cV.A.v2 Roseolovirus-2sp,rensp.pdf. Dostupný na: www:

<http://talk.ictvonline.org/files/ictv_official_taxonomy_updates_since_the_8th_report/m/vertebrate-official/default.aspx>.
2. **Ablashi, D. V. et al.** Human herpesvirus-6 strain groups: a nomenclature. *Arch. Virol.,* 1993, vol. no. 129, p. 363–366.
3. **Arbuckle, J. H. et al.** The latent human herpesvirus-6A genome specifically integrates in telomeres of human chromosomes in vivo and in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 2010, vol. 107, no. 12, p. 5563–5568.
4. **Arbuckle, J. H., Medveczky, P. G.** The molecular biology of human herpesvirus-6 latency and telomere integration. *Microbes Infect.,* 2011, vol. 13, no. 8–9, p. 731–741.
5. **Caserta, M. T. et al.** Diagnostic assays for active infection with human herpesvirus 6 (HHV-6). *J. Clin. Virol.,* 2010, vol. 48, no. 1, p. 55–57.
6. **Clark, D. A. et al.** Transmission of integrated human herpesvirus 6 through stem cell transplantation: implications for laboratory diagnosis. *J. Infect. Dis.,* 2006, vol. 193, no. 7, p. 912–916.
7. **Clark, D. A. et al.** Reply to Boutolleau et al. and Luppi et. al. *J. Infect. Dis.,* 2006, vol. 194, no. 7, p. 1021–1023.
8. **Daibata, M. et al.** Inheritance of chromosomally integrated human herpesvirus 6 DNA. *Blood,* 1999, vol. 94, no. 5, p. 1545–1549.
9. **De Bolle, L., Naesens, L., De Clercq, E.** Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy. *Clin. Microbiol. Rev.,* 2005, vol. 18, no. 1, p. 217–245.
10. **De Pagter, P. J. et al.** Chromosomally integrated human herpesvirus 6: transmission via cord blood-derived unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.,* 2010, vol. 16, no. 1, p. 130–132.
11. **Hubacek, P. et al.** Disappearance of pre-existing high HHV-6 DNA load in blood after allogeneic SCT. *Bone Marrow Transplant.,* 2007, vol. 40, no. 8, p. 805–806.
12. **Hubacek, P. et al.** Failure of multiple antivirals to affect high HHV-6 DNAaemia resulting from viral chromosomal integration in case of severe aplastic anaemia. *Haematologica,* 2007, vol. 92, no. 10, p. e98–e100.
13. **Hubacek, P. et al.** Prevalence of HHV-6 integrated chromosomally among children treated for acute lymphoblastic or myeloid leukemia in the Czech Republic. *J. Med. Virol.,* 2009, vol. 81, no. 2, p. 258–263.
14. **Hubacek, P. et al.** HHV-6 DNA throughout the tissues of two stem cell transplant patients with chromosomally integrated HHV-6 and fatal CMV pneumonitis. *Br. J. Haematol.,* 2009, vol. 145, no. 3, p. 394–398.
15. **Humar, A. et al.** An assessment of herpesvirus co-infections in patients with CMV disease: correlation with clinical and virologic outcomes. *Am. J. Transplant.,* 2009, vol. 9, no. 2, p. 374–381.
16. **Jeulin, H. et al.** Contribution of human herpesvirus 6 (HHV-6) viral load in whole blood and serum to investigate integrated HHV-6 transmission after haematopoietic stem cell transplantation. *J. Clin. Virol.,* 2009, vol. 45, no. 1, p. 43–46.
17. **Josephs, S. F. et al.** Genomic analysis of the human B-lymphotropic virus (HBLV). Science, 1986, vol. 234, no. 4776, p. 601–603.
18. **Kamble, R. T. et al.** Transmission of integrated human herpesvirus-6 in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.,* 2007, vol. 40, no. 6, p. 563–566.
19. **Kaufer, B. B., Jarosinski, K. W., Osterrieder, N.** Herpesvirus telomeric repeats facilitate genomic integration into host telomeres and mobilization of viral DNA during reactivation. *J. Exp. Med.,* 2011, vol. 208, no. 3, p. 605–615.
20. **Kishi, M. et al.** Inverted repeat regions of Marek's disease virus DNA possess a structure similar to that of the a sequence of herpes simplex virus DNA and contain host cell telomere sequences. *J. Virol.,* 1991, vol. 65, no. 6, p. 2791–2797.
21. **Klein, L. et al.** Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat. Rev. Immunol.,* 2009, vol. 9, no. 12, p. 833–844.
22. **Lee, S. O. et al.** Chromosomally integrated human herpesvirus-6 in kidney transplant recipients. *Nephrol. Dial. Transplant.,* 2011, vol. 26, no. 7, p. 2391–2393.
23. **Lee, S. O., Brown, R. A., Razonable, R. R.** Clinical significance of pretransplant chromosomally integrated human herpesvirus-6 in liver transplant recipients. *Transplantation,* 2011, vol. 92, no. 2, p. 224–229.
24. **Ljungman, P. et al.** Management of CMV, HHV-6, HHV-7 and Kaposi-sarcoma herpesvirus (HHV-8) infections in patients with hematological malignancies and after SCT. *Bone Marrow Transplant.,* 2008, vol. 42, no. 4, p. 227–240.
25. **Luo, W. J. et al.** Epstein-Barr virus is integrated between REL and BCL-11A in American Burkitt lymphoma cell line (NAB-2). *Lab. Invest.,* 2004, vol. 84, no. 9, p. 1193–1199.
26. **Morissette, G., Flamand, L.** Herpesviruses and chromosomal integration. *J. Virol.,* 2010, vol. 84, no. 23, p. 12100–12109.
27. **Mukai, T. et al.** Molecular epidemiological studies of human herpesvirus 6 in families. *J. Med. Virol.,* 1994, vol. 42, no. 3, p. 224–227.
28. **Nacheva, E. P. et al.** Human herpesvirus 6 integrates within telomeric regions as evidenced by five different chromosomal Sites. *J. Med. Virol.,* 2008, vol. 80, no. 11, p. 1952–1958.
29. **Nicholls, C. et al.** Molecular regulation of telomerase activity in aging. *Protein Cell,* 2011, vol. 2, no. 9, p. 726–738.
30. **Pellett, P. E. et al.** Chromosomally integrated human herpesvirus 6: questions and answers. *Rev. Med. Virol.,* 2011, vol. E-pub ahead of print, no. s.
31. **Pradillo, M., Santos, J. L.** The template choice decision in meiosis: is the sister important? *Chromosoma,* vol. 120, no. 5, p. 447–454.
32. **Tanaka-Taya, K. et al.** 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, vol. 73, no. 3, p. 465–473.
33. **Thader-Voigt, A. et al.** Development of a microwell adapted immunoblot system with recombinant antigens for distinguishing human herpesvirus (HHV)6A and HHV6B and detection of human cytomegalovirus. *Clin. Chem. Lab. Med.,* 2011, vol. 49, no. 11, p. 1891–1898.
34. **Volin, L. et al.** Human herpesvirus 6 antigenaemia in allogeneic stem cell transplant recipients: impact on clinical course and association with other beta-herpesviruses. *Br. J. Haematol.,* 2004, vol. 126, no. 5, p. 690–696.
35. **Wang, L. R. et al.** Correlations of human herpesvirus 6B and CMV infection with acute GVHD in recipients of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant, 2008, vol. 42, no. 10, p. 673–677.
36. **Ward, K. N.** The natural history and laboratory diagnosis of human herpesviruses-6 and -7 infections in the immunocompetent. *J. Clin. Virol.,* 2005, vol. 32, no. 3, p. 183–193.

37. **Ward, K. N. et al.** 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, vol. 44, no. 4, p. 1571–1574.
38. **Ward, K. N. et al.** HHV-6 DNA level in CSF due to primary infection differs from that in chromosomal viral integration and has implications for the diagnosis of encephalitis. *J. Clin. Microbiol.,* 2007, vol. 45, no. 4, p. 1298–1304.
39. **Yamanishi, K., Yasuko, M., Pellett, P. E.** *Human herpesvirus 6 and 7.* In Knipe, D. M., Howley, P. M., editors. *Fields Virology.* Fifth ed., Philadelphia, PA Lippincott Williams & Wilkins | Wolters Kluwer Business; 2007. p. 2819–2845.

Do redakce došlo dne 8. 2. 2012.

Kontaktní adresa:
MUDr. Petr Hubáček, Ph.D.
Ústav lékařské mikrobiologie 2. LF UK a FN Motol
FN Motol
V Úvalu 84
150 06 Praha 5-Motol
e-mail: petr.hubacek@lfmotol.cuni.cz

10.3 Příloha 3 – Článek 3

Journal of Medical Virology 81:258–263 (2009)

Prevalence of HHV-6 Integrated Chromosomally Among Children Treated for Acute Lymphoblastic or Myeloid Leukemia in the Czech Republic

Petr Hubacek,[1]* Katerina Muzikova,[1] Alena Hrdlickova,[2] Ondrej Cinek,[2] Katerina Hyncicova,[2] Hana Hrstkova,[3] Petr Sedlacek,[1] and Jan Stary[1]

[1]*Department of Paediatric Haematology and Oncology, Motol University Hospital, Prague, Czech Republic*
[2]*Department of Paediatrics, Motol University Hospital, Prague, Czech Republic*
[3]*1st Department of Paediatrics, Brno University Hospital, Brno, Czech Republic*

Chromosomal integration of *human herpesvirus 6* (HHV-6) is a novel situation found in a small percentage of individuals. While active HHV-6 infection is treatable using antivirals, the abnormally high level of HHV-6 DNA found in chromosomal integration of HHV-6 (CI-HHV-6) is not affected by such drugs. Stored DNA samples taken originally for detection of fusion genes and minimal residual disease from 339 pediatric patients treated for leukemia in the Czech Republic between the years 1995–2007 were tested retrospectively. Using real-time quantitative PCR technology, the quantity of HHV-6 DNA detected was normalized to 100,000 human genome equivalents as assessed by quantitation of the albumin gene. HHV-6 DNA was detected in 107 samples from 91 patients (26.8%). In the majority of samples (99) only a minute level of normalized viral copies (NVCs) (median 1.84 NVCs) was detected. A high viral load of approximately 100,000 NVCs was detected in 5 patients (1.5%; median 140,150 NVCs), in all of whom were confirmed subsequently CI-HHV-6 by a detection of HHV-6 DNA in hair follicles or in the nails. In all but one patient with HHV-6 variant B, variant A of the virus was detected. None of the patients with CI-HHV-6 had complications attributable to HHV-6 infection. The prevalence of CI-HHV-6 in childhood leukemia does not differ from that published for other patients or healthy populations. Where high levels of HHV-6 DNA are present, CI-HHV-6 should be confirmed as soon as possible so that potentially toxic but ineffective antiviral treatment can be stopped. ***J. Med. Virol. 81:258–263, 2009.*** © 2008 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: human herpesvirus 6; leukemia; chromosomal integration

© 2008 WILEY-LISS, INC.

INTRODUCTION

Human herpesvirus 6 (HHV-6) is a common beta-herpesvirus known to cause exanthem subitum (sixth disease), a benign illness of childhood [Yoshikawa, 2004; Ward, 2005]. It has also been associated with encephalitis and febrile illness [Asano et al., 1992; Jones et al., 1994; Oki et al., 1995; Caserta et al., 2001], hepatitis [Ishikawa et al., 2002], myocarditis [Yoshikawa et al., 2001], and thrombocytopenia [Yoshikawa et al., 1993]. In the immunocompromised host, HHV-6 has been implicated in a number of different diseases such as fever and rash [Sashihara et al., 2002], hepatitis [Ljungman et al., 2000], encephalitis [Bethge et al., 1999; Yoshihara et al., 2004], thrombocytopenia [Yoshikawa et al., 1993] and delayed platelet and granulocyte engraftment [Ljungman et al., 2000; Zerr et al., 2005]. There are two variants of the virus: A and B, and it is noteworthy that in most of the pathological conditions, only variant B has been detected [Suga et al., 1993; Caserta et al., 2001; Yoshikawa, 2004; Ward, 2005]. Due to improved laboratory tests based on nucleic acid assays, HHV-6 has been detected in clinical samples more frequently during the last few years and is an emerging opportunistic pathogen [De Bolle et al., 2005].

An interesting feature of the virus is chromosomal integration of HHV-6 DNA (CI-HHV-6) which is found in some individuals and is characterized by abnormally

Grant sponsor: Czech Ministry of Health; Grant number: FNM00064203; Grant sponsor: Czech Ministry of Education; Grant number: MSMT0021620813.

*Correspondence to: Petr Hubacek, MD, Department of Paediatric Haematology and Oncology, Motol University Hospital, V Uvalu 84, CZ-150 06, Prague 5, Motol, Czech Republic. E-mail: petr.hubacek@lfmotol.cuni.cz

Accepted 11 September 2008
DOI 10.1002/jmv.21371
Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com)

high levels of HHV-6 DNA. This situation was first described by Luppi et al. [1993] in patients without any symptoms of HHV-6 infection. Later Daibata et al. [1999] showed inheritance of CI-HHV-6 through two generations and HHV-6 DNA has been located precisely on chromosomes 1, 11, 17, and 22, respectively [Daibata et al., 1998; Daibata et al., 1999; Clark et al., 2006a]. Since CI-HHV-6 can be inherited, it seems clear that this viral DNA must be in every cell in the body [Clark et al., 2006b]. Indeed in patients with CI-HHV-6, HHV-6 DNA can be detected in hair follicles [Ward et al., 2006], skin fibroblasts [Daibata et al., 2000], leukocytes [Clark et al., 2006a] and in CSF [Ward et al., 2007], but it should also be detectable in every sample which contains human DNA, for example in the nails, bronchoalveolar lavage.

CI-HHV-6 is a relatively common phenomenon being present in 0.2–2.9% of the human population [Tanaka-Taya et al., 2004; Leong et al., 2007; Ward et al., 2007] but no study on the incidence of CI-HHV-6 has been carried out on patients with hematological malignancies or individuals in Central Europe. The aim of the present study was to determine retrospectively the prevalence of CI-HHV-6 among children treated for acute lymphoblastic leukemia or acute myeloid leukemia in the Czech Republic and to investigate whether in this cohort of immunosuppressed patients there were any symptoms or signs attributable to the CI-HHV-6.

MATERIALS AND METHODS

Patients

This retrospective study was carried out on stored DNA samples obtained from 339 children and adolescents diagnosed and treated for acute lymphoblastic leukemia (ALL) (no. of patients = 318; median age at diagnosis 5.3 years, range 2 days–18.3 years) or acute myeloid leukemia (AML) (no of patients = 21; median age at diagnosis 7.5 year, range 3 days–17.7 years) during the years 1995–2007. The samples were taken for the molecular biological detection of fusion genes in these leukemias (e.g., BCR/ABL, TEL/AML1 and any others which might have had implications for prognosis) and for quantitation of minimal residual disease during treatment. Patients were treated according to the following protocols: ALL-BFM 95, AML-BFM 98, International collaborative treatment protocol for infants under 1 year with acute lymphoblastic leukemia (Interfant 99 and 06, ALL-BFM REZ 2002, ALL IC-BFM 2002, AML-BFM REZ 2003, AML-BFM 2004. Chemotherapy treatment according to the above protocols is usually between 6 and 12 months long. The patients or their guardians gave informed consent for use of the samples for further scientific investigation. The study was approved by the local ethics committee.

Samples

Samples were taken at diagnosis or during treatment of the leukemia. DNA was extracted from nucleated blood cells using QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions and was then stored at −20°C.

For the present study, a sample that contained enough DNA was chosen randomly from each patient. If the patient underwent an allogeneic hematopoietic stem cell transplant only the pre-transplant samples were tested. In the patients suspected of CI-HHV-6 because of an abnormally high level of viral DNA of about one copy/cell [Hubacek et al., 2007b], DNA from hair follicles and nails was extracted using the QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. In those hematopoietic stem cell transplant recipients with suspected CI-HHV-6, we tested for HHV-6 DNA in samples obtained during posttransplant viral surveillance.

Quantitative PCR

The amount of human DNA was determined by quantitation of the human albumin gene using the method published by Pongers-Willemse et al. [1998] and detection simultaneously of fusion genes as a control to identify false negative results.

In those samples chosen for study, the quantity of HHV-6 DNA was also measured using the primers and probe as described by Gautheret-Dejean et al. [2002]. The results were adjusted to 100,000 human genome equivalents by relating them to the quantity of human albumin gene DNA. Real-time quantitative PCR (RQ-PCR) testing was performed on an ABI 7300 machine (Applied Biosystems, Foster City, CA) or BioRad iQCycler (BioRad, Hercules, CA). The PCR reactions quantifying HHV-6 were carried out in 25 μl containing 1× PCR buffer, 3.5 mM $MgCl_2$, 5% glycerol, 100 μM each dNTP (Sigma–Aldrich, Prague, Czech Republic), 500 nM primers, 200 nM FAM-labeled probe and 0.5 U HotStar Taq Polymerase (Qiagen). After 15 min at 95°C, the samples were amplified by 45 times for 15 sec at 94°C and 1 min at 60°C at which point in each cycle the fluorescence was measured.

Samples with low levels of HHV-6 DNA were considered a result of benign viral reactivation during severe immunosuppression. In patients suspected of having CI-HHV-6, whose sample contained approximately 100,000 normalized viral copies (NVCs) of HHV-6 DNA, all other stored samples acquired during the treatment were tested. In addition, the hair follicles or nails of these patients were tested for HHV-6 DNA and expressed the results as NVCs.

Distinguishing Variant A and B of the Virus

To distinguish between A and B variants of HHV-6 in patients with CI-HHV-6, a set of variant-specific nested PCR assays targeted to the immediate early antigen was used; the sequences of the primers and lengths of amplicons are listed in Table I. Both rounds of nested PCR were performed in 15 μl containing of 1x PCR buffer, 3.0 mM $MgCl_2$, 100 μM each dNTP (Sigma–Aldrich), 600 nM primers and 1 unit of Promega

TABLE I. Sequences of Primers Used for Discrimination Between HHV-6 A and B Variants

Designation	Sequence	Source	Length of the amplicon (bp)
HHV-6-A variant			
First round			
Forward	5′-CTGATATTAAAGTGTTGCCA-3′	Our design	321
Reverse	5′-AGGAATCTTCTATCGAATCT-3′		
Second round			
Forward	5′-GGAACCATCTTGTTCTGTCC-3′	Nitsche et al. [2001]	276
Reverse	5′-CATGAAGATGATGACAATAAAATG-3′		
HHV-6-B variant			
First round			
Forward	5′-AACTACTTGAAACTCAAC-3′	Our design	223
Reverse	5′-CTTTCTGGATTTAGAGTATC-3′		
Second round			
Forward	5′-GAGTTGCTGAGTTGGTAAAGG-3′	Nitsche et al. [2001]	142
Reverse	5′-GAGACCGGGTCTGGACAACA-3′		

Taq polymerase (Promega, Madison, WI). The template volume was 2 µl of DNA in both rounds. The PCR reactions were performed on an ABI 9700 machine with the thermal profile consisting of 2 min denaturation at 94°C, followed by 30 cycles of 30 sec at 94°C, 30 sec at 55°C and 30 sec at 72°C, and a final extension for 1 min at 72°C. After the first PCR round, the products were diluted 1:100 with distilled water, before being subjected to the second round of amplification. The touchdown principle was used: the thermal profile consisted of denaturation for 2 min at 94°C, followed by 30 cycles of 30 sec at 94°C, 30 sec of annealing and 20 sec at 72°C. The annealing temperature was 70°C in the first five cycles, 67°C in the following five cycles, 65°C in the next five cycles, and 60°C in the remaining 20 cycles. The final synthesis lasted 1 min at 72°C. All samples were tested in duplicate. Amplicons were detected on a 2% agarose gel run at approximately 10 V/cm for 30 min. With each run, a negative no-template control, and positive controls of the A variant (DNA obtained from viral culture supernatant, confirmed by sequencing), and the B variant (from a HHV-6-B positive sample, confirmed by sequencing) were included.

RESULTS

Three hundred sixty-seven samples of peripheral blood or bone marrow obtained from the patients were screened. HHV-6 DNA was detected in 107 samples (28.3%) from 91 patients (26.8%). In only five of the patients, was an abnormally high level of HHV-6 DNA detected (approximately 100,000 NVCs; median of 140,150 NVCs), while in the rest of the positive patients the median HHV-6 DNA load was only 1.83 NVCs ($P < 0.003$ by Student's t-test; see Fig. 1).

In the five patients with a very high HHV-6 DNA load and hence suspected CI-HHV-6, the presence of HHV-6 DNA were confirmed in hair follicles and in nails as well as in blood samples (see Fig. 2). The levels detected in all five patients were very similar both in the blood and the nails/hair and remained at the same level throughout treatment with chemotherapy. In four out of the five patients HHV-6 A, and in the fifth variant B were detected. Two of these patients underwent allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and there was a rapid decline of detectable HHV-6 DNA after the hematopoietic stem cell transplant in both of patients [see Fig. 2 and Hubacek et al., 2007a]. The medical histories of the CI-HHV-6 positive patients were examined carefully for complications attributable to

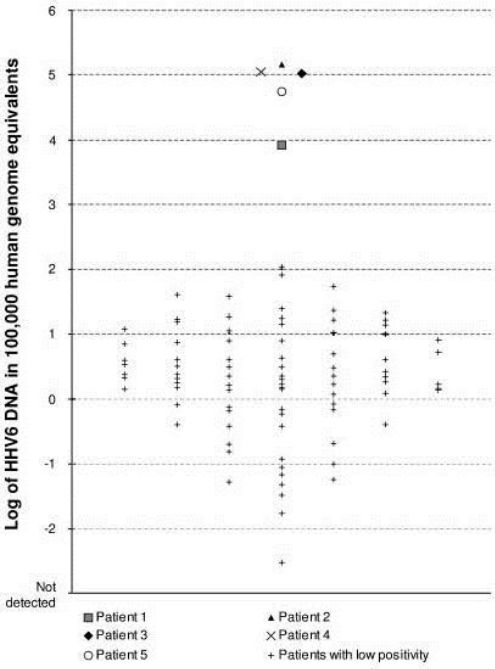


Fig. 1. Amount of *HHV-6* DNA detected on screening of samples of peripheral blood or bone marrow from 91 *HHV-6* positive of leukemic patients.

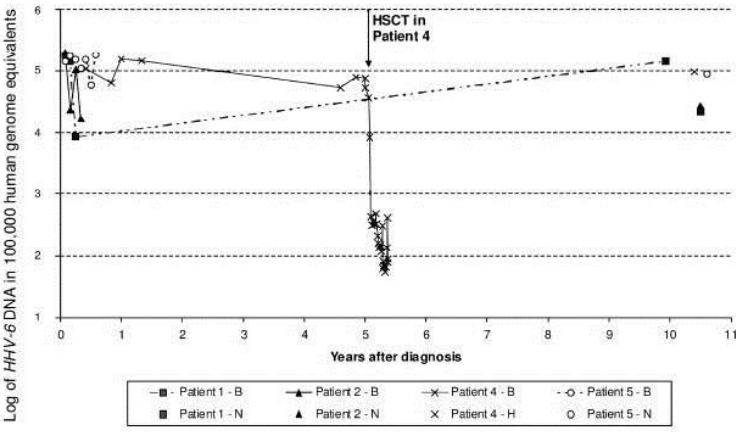


Fig. 2. Amount of *HHV-6* DNA normalized to 100,000 human genome equivalents detected in blood samples (B), in hair (H) and nails (N) of the patients with CI-HHV-6. Data on Patient 3 appeared in Hubacek et al. [2007a].

HHV-6 infection, but none were found. However, in four patients toxic adverse effects of chemotherapy such as hepatitis and rash (see Table II) were identified clearly.

DISCUSSION

The overall prevalence of HHV-6 DNA in the pediatric patients with leukemias was 28.3% which is very similar to the 37.5% and 30% of HHV-6 positive reported in hematological patients (both adults and children) [Ma et al., 2000; Chemaly et al., 2008]. The prevalence of HHV-6 DNA in the group of pediatric patients studied is similar to adult data [Ma et al., 2000; Chemaly et al., 2008] and slightly lower prevalence in comparison with pediatric patients from China with a prevalence of 40% [Ma et al., 2000].

After normalizing the HHV-6 DNA load to the quantity of human genome equivalents, two distinct levels emerged: one abnormally high level from five patients with suspected CI-HHV-6 whereas the lower level observed in the majority was consistent with virus reactivation. To confirm that low level positivity represents only viral reactivation, an additional small prospective study among 22 children treated at Motol University Hospital was carried out. HHV-6 DNA was detected in nine children with low positivity (median load of 20.4 NVCs). HHV-6 DNA was not detected in control samples from whole blood and nails in any of these positive children. Therefore, adjustment is advantageous in patients whose white blood cell count vary greatly such as leukemic and hematopoietic stem cell transplant patients during neutropenia, bone marrow regeneration after chemotherapy or transplantation, and after use of granulocyte-colony stimulating factor. Thus, despite the differences in the absolute amount of viral DNA in blood in these patients, the adjusted ratio to normal makes it easy to distinguish between abnormally high and lower levels.

TABLE II. Clinical Features of the Patients With CI-HHV-6

Number of patient	Type of leukemia (age at diagnosis/relapse/HSCT)	Treatment protocols	Complications during the treatment
1	ALL (13.9 years)	ALL-BFM 95	Hyperkalcemia, bronchopneumonia, enterocolitis, febrile neutropenia
2	ALL (15.0 years)	ALL-BFM 95	Acute renal failure at diagnosis, hepatopathy, 1× allergic reaction after platelets substitution
3	ALL (3.0 years)	ALL-BFM 95	No significant complication
	(6.4 years)	ALL-BFM REZ 2002	Dermatitis after Mtx, infection of central venous catheter, febrile neutropenia
	(6.7 years)	HSCT	Acute GvHD grade II, hemorhagic cystitis, polyneuropathy
4	ALL (2.9 years)	ALL-BFM 95	No significant complication
	(5.4 years)	ALL-BFM REZ 2002	No significant complication
	(8.3 years)	HSCT	Deceased due to CMV pneumonia 137 days after HSCT
5	ALL (4.3 years)	ALL-IC BFM 2002	Enteritis, febrile neutropenia, asparaginase allergy

ALL, acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myeloid leukemia; HSCT, hematopoietic stem cell transplantation; Mtx, methotrexate; GvHD, graft versus host disease; CMV, human cytomegalovirus.

The five patients were suspected to have CI-HHV-6 on the basis of an HHV-6 DNA load of about one copy/cell (about 100,000 NVCs), that is, at the abnormally high level already demonstrated in CI-HHV-6 [Ward et al., 2006; Hubacek et al., 2007b]. Two were confirmed with CI-HHV-6 based on the detection of HHV-6 DNA in hair follicles at a level of about one copy/cell and the other three had viral DNA in the nails at a level of about one copy/cell. DNA extracted from the nails can therefore be also used for confirmation of CI-HHV6 as is used for studies of chimaerism after hematopoietic stem cell transplant [Uchida et al., 1996].

The prevalence of 1.4% CI-HHV-6 among the patients studied is in agreement with published observations on Japanese patients referred to Osaka University Hospital (0.2%) [Tanaka-Taya et al., 2004], UK blood donors (0.8%) [Leong et al., 2007], CSF samples from UK children younger than 2 years of age (2.0%) or older (1.3%) [Ward et al., 2007] and in patients referred to the Royal Free Hospital, London (2.9%) [Leong et al., 2007].

Importantly, clinical problems attributable to CI-HHV-6 have not been observed in the present study. Hepatitis, neuropathy, skin rash and other complications which occurred in the patients with CI-HHV-6 were those also present commonly in the rest of our patients treated for leukemia. All are well known side effects of chemotherapy or allergic reactions following the repeated administration of blood derivatives and in all the CI-HHV-6 cases there was always a clear relationship between such symptoms and therapeutic procedures. Furthermore, without any complications related to HHV-6, Patients 3 and 4 had a rapid decline of detectable HHV-6 DNA in whole blood after allogeneic hematopoietic stem cell transplant which correlated inversely with replacement of their hematopoietic system with that of the donor who did not have CI-HHV-6 [Hubacek et al., 2007a].

In conclusion, the data strongly suggests that CI-HHV-6 is not able to reactivate from its chromosomal site to give rise to active infection even under immunosupression induced by chemotherapy. Therefore, the highest risk for patients with CI-HHV-6, in whom high levels of HHV-6 DNA are detected, remains an unnecessary and ineffectual use of toxic antivirals [Hubacek et al., 2007b] and the failure to search further for the true cause of unexplained clinical problems.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank the clinical teams of the Working Group for Paediatric Haematology of the Czech Republic for access to samples and clinical records and, Dr. Pavel Timr, Hospital of Ceske Budejovice,and Dr. Tomas Kuhn, Ostrava Teaching Hospital for providing us with nails or hair follicles from patients suspected during screening of having CI-HHV-6.

REFERENCES

Asano Y, Yoshikawa T, Kajita Y, Ogura R, Suga S, Yazaki T, Nakashima T, Yamada A, Kurata T. 1992. Fatal encephalitis/encephalopathy in primary human herpesvirus-6 infection. Arch Dis Child 67:1484–1485.

Bethge W, Beck R, Jahn G, Mundinger P, Kanz L, Einsele H. 1999. Successful treatment of human herpesvirus-6 encephalitis after bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant 24:1245–1248.

Caserta MT, Mock DJ, Dewhurst S. 2001. Human herpesvirus 6. Clin Infect Dis 33:829–833.

Chemaly RF, Torres HA, Hachem R, Kontoyiannis DP, Safdar A, Raad II. 2008. Human herpesvirus-6 DNAemia in immunosuppressed adult patients with leukemia at risk for mold infection. Haematologica 93:157–158.

Clark DA, Nacheva EP, Leong HN, Brazma D, Li YT, Tsao EH, Buyck HC, Atkinson CE, Lawson HM, Potter MN, Griffiths PD. 2006a. Transmission of integrated human herpesvirus 6 through stem cell transplantation: Implications for laboratory diagnosis. J Infect Dis 193:912–916.

Clark DA, Tsao EH, Leong HN, Ward KN, Nacheva EP, Griffiths PD. 2006b. Reply to Boutolleau et al. and Luppi et al. J Infect Dis 194: 1021–1023.

Daibata M, Taguchi T, Taguchi H, Miyoshi I. 1998. Integration of human herpesvirus 6 in a Burkitt's lymphoma cell line. Br J Haematol 102:1307–1313.

Daibata M, Taguchi T, Nemoto Y, Taguchi H, Miyoshi I. 1999. Inheritance of chromosomally integrated human herpesvirus 6 DNA. Blood 94:1545–1549.

Daibata M, Taguchi T, Miyoshi K, Taguchi H, Miyoshi I. 2000. Presence of human herpesvirus 6 DNAin somatic cells. Blood 95:1108–1109.

De Bolle L, Naesens L, De Clercq E. 2005. Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy. Clin Microbiol Rev 18:217–245.

Gautheret-Dejean A, Manichanh C, Thien-Ah-Koon F, Fillet AM, Mangeney N, Vidaud M, Dhedin N, Vernant JP, Agut H. 2002. Development of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of human herpesvirus-6 infection and application to bone marrow transplant patients. J Virol Methods 100:27–35.

Hubacek P, Hyncicova K, Muzikova K, Cinek O, Zajac M, Sedlacek P. 2007a. Disappearance of pre-existing high HHV-6 DNA load in blood after allogeneic SCT. Bone Marrow Transplant 40:805–806.

Hubacek P, Maalouf J, Zajickova M, Kouba M, Cinek O, Hyncicova K, Fales I, Cetkovsky P. 2007b. Failure of multiple antivirals to affect high HHV-6 DNAaemia resulting from viral chromosomal integration in case of severe aplastic anaemia. Haematologica 92:e98–e100.

Ishikawa K, Hasegawa K, Naritomi T, Kanai N, Ogawa M, Kato Y, Kobayashi M, Torii N, Hayashi N. 2002. Prevalence of herpesviridae and hepatitis virus sequences in the livers of patients with fulminant hepatitis of unknown etiology in Japan. J Gastroenterol 37:523–530.

Jones CM, Dunn HG, Thomas EE, Cone RW, Weber JM. 1994. Acute encephalopathy and status epilepticus associated with human herpes virus 6 infection. Dev Med Child Neurol 36:646–650.

Leong HN, Tuke PW, Tedder RS, Khanom AB, Eglin RP, Atkinson CE, Ward KN, Griffiths PD, Clark DA. 2007. The prevalence of chromosomally integrated human herpesvirus 6 genomes in the blood of UK blood donors. J Med Virol 79:45–51.

Ljungman P, Wang FZ, Clark DA, Emery VC, Remberger M, Ringden O, Linde A. 2000. High levels of human herpesvirus 6 DNA in peripheral blood leucocytes are correlated to platelet engraftment and disease in allogeneic stem cell transplant patients. Br J Haematol 111:774–781.

Luppi M, Marasca R, Barozzi P, Ferrari S, Ceccherini-Nelli L, Batoni G, Merelli E, Torelli G. 1993. Three cases of human herpesvirus-6 latent infection: Integration of viral genome in peripheral blood mononuclear cell DNA. J Med Virol 40:44–52.

Ma XT, Song YH, Lu DM, Mu GF, Li G, Ji LX, Yang RC, Wu KF. 2000. Human herpesvirus 6 in hematologic diseases in China. Haematologica 85:458–463.

Nitsche A, Muller CW, Radonic A, Landt O, Ellerbrok H, Pauli G, Siegert W. 2001. Human herpesvirus 6A DNA Is detected frequently in plasma but rarely in peripheral blood leukocytes of patients after bone marrow transplantation. J Infect Dis 183:130–133.

Oki J, Yoshida H, Tokumitsu A, Takahashi S, Miyamoto A, Yoda M, Miura J. 1995. Serial neuroimages of acute necrotizing encephalopathy associated with human herpesvirus 6 infection. Brain Dev 17:356–359.

Pongers-Willemse MJ, Verhagen OJ, Tibbe GJ, Wijkhuijs AJ, de Haas V, Roovers E, van der Schoot CE, van Dongen JJ. 1998. Real-time

quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using junctional region specific TaqMan probes. Leukemia 12:2006–2014.

Sashihara J, Tanaka-Taya K, Tanaka S, Amo K, Miyagawa H, Hosoi G, Taniguchi T, Fukui T, Kasuga N, Aono T, Sako M, Hara J, Yamanishi K, Okada S. 2002. High incidence of human herpesvirus 6 infection with a high viral load in cord blood stem cell transplant recipients. Blood 100:2005–2011.

Suga S, Yoshikawa T, Asano Y, Kozawa T, Nakashima T, Kobayashi I, Yazaki T, Yamamoto H, Kajita Y, Ozaki T, Nishimura Y, Yamanaka T, Yamada A, Imamshi J. 1993. Clinical and virological analyses of 21 infants with exanthem subitum (roseola infantum) and central nervous system complications. Ann Neurol 33:597–603.

Tanaka-Taya K, Sashihara J, Kurahashi H, Amo K, Miyagawa H, Kondo K, Okada S, Yamanishi K. 2004. 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 73:465–473.

Uchida S, Wang L, Yahagi Y, Tokunaga K, Tadokoro K, Juji T. 1996. Utility of fingernail DNA for evaluation of chimerism after bone marrow transplantation and for diagnostic testing for transfusion-associated graft-versus-host disease. Blood 87:4015–4016.

Ward KN. 2005. The natural history and laboratory diagnosis of human herpesviruses-6 and -7 infections in the immunocompetent. J Clin Virol 32:183–193.

Ward KN, Leong HN, Nacheva EP, Howard J, Atkinson CE, Davies NW, Griffiths PD, Clark DA. 2006. Human herpesvirus 6 chromosomal integration in immunocompetent patients results in high levels of viral DNA in blood, sera, and hair follicles. J Clin Microbiol 44:1571–1574.

Ward KN, Leong HN, Thiruchelvam AD, Atkinson CE, Clark DA. 2007. HHV-6 DNA level in CSF due to primary infection differs from that in chromosomal viral integration and has implications for the diagnosis of encephalitis. J Clin Microbiol 45:1298–1304.

Yoshihara S, Kato R, Inoue T, Miyagawa H, Sashihara J, Kawakami M, Ikegame K, Oka Y, Sugiyama H, Kawase I, Ogawa H. 2004. Successful treatment of life-threatening human herpesvirus-6 encephalitis with donor lymphocyte infusion in a patient who had undergone human leukocyte antigen-haploidentical nonmyeloablative stem cell transplantation. Transplantation 77:835–838.

Yoshikawa T. 2004. Human herpesvirus 6 infection in hematopoietic stem cell transplant patients. Br J Haematol 124:421–432.

Yoshikawa T, Asano Y, Kobayashi I, Nakashima T, Yazaki T. 1993. Exacerbation of idiopathic thrombocytopenic purpura by primary human herpesvirus 6 infection. Pediatr Infect Dis J 12:409–410.

Yoshikawa T, Ihira M, Suzuki K, Suga S, Kito H, Iwasaki T, Kurata T, Tanaka T, Saito Y, Asano Y. 2001. Fatal acute myocarditis in an infant with human herpesvirus 6 infection. J Clin Pathol 54:792–795.

Zerr DM, Corey L, Kim HW, Huang ML, Nguy L, Boeckh M. 2005. Clinical outcomes of human herpesvirus 6 reactivation after hematopoietic stem cell transplantation. Clin Infect Dis 40:932–940.

10.4 Příloha 4 – Poster

Chromosomally integrated HHV-6 in healthy donors and patiens treated for haematological malignancy

Petr Hubáček, Alena Hrdličková aj.

str 148-149

Poster a abstrakt ve sborníku Evropské konference klinické mikrobiologie a infekčních nemocí (ECCMID 2012, Londýn 2.4. 2012)

10.5 Příloha 5 – Sekvence primerů pro reverzní transkripci

Název	Sekvence od 5´ do 3´
6A-U3-F	TTATGCGCACACGTGGTTAT
6A-U3-R	TCTCGAAAACACAGCACGTC
6A-U12-F	GCTTTTGGTTAGCCCGTGTA
6A-U12-R	TGAATCCTTGCGTTTCTGTG
6A-U17-F	GGTTATCGGAAGCATTGGAA
6A-U17-R	ACAACGGCAAAATTTCTTGG
6A-U18-F	GATCATAGCGCAGGAGGTGT
6A-U18-R	ATGCGCAACCTTTTTCTTGT
6A-U19-F	GCTGGTACAAGAGTGCACGA
6A-U19-R	TCGCATGTGAAATTCGATGT
6A-U22-F	GGCTCAGAGAAACGGAACTG
6A-U22-R	TCCACGAACACAACACCAAT
6A-U29-F	TGAGGGAATCGAAGATGGAC
6A-U29-R	CCCAGTGCGTATTTTGACCT
6A-U30-F	ATTCAGTTTCCAGGCGACAC
6A-U30-R	AGTTCTGGGCTGTTTCCTGA
6A-U31-F	ACGTTTATCTACCGCCGATG
6A-U31-R	CAGTATTGTTGGGCGGAAGT
6A-U38-F	TGATGGCGCATAATCTGTGT
6A-U38-R	CATCTCCGCCTTCACTTCTC
6A-U39-F	CCGGACGAATTGAGTAGAGC
6A-U39-R	CCACTCCACCCACAATATCC
6A-U42-F	CATCACCGTCATGAAATTCG
6A-U42-R	CTCGGAGTTTGGCATCTCTC
6A-U43-F	ACGGGCAAACAGAAGGTATG
6A-U43-R	TTTGTCTGGCGTACGTTGAG
6A-U48-F	TGCTAGCCGAAATAGCGAAT
6A-U48-R	TCGATAACGGTCAAGGGAAG
6A-U51-F	GTCGGTCGAGAATACGCTGT
6A-U51-R	AGCCTTGGAATTCTCGTTCA
6A-U54-F	CGGCCTCTCTACATCACCAT
6A-U54-R	TGCAACCGTGCTTAGACTTG
6A-U57-F	TAACGTTCGGCGGAATTAAC
6A-U57-R	TCTGTTTGGGTGTGGTCGTA
6A-U64-F	CGCAAACGTATCAAGTCGTG
6A-U64-R	AATCTTTCCCGAGCTGCATA
6A-U73-F	TACATTTGTGTCCGCGATGT
6A-U73-R	GAGTGGAAACCGAGACCGTA
6A-U74-F	TGGGACCTTCAGGAACAAAG
6A-U74-R	ACAGGTACCGTGTCCAGAGG
6A-U75-F	ACTGCAAGAACTGCGACTCA

Název	Sekvence od 5´do 3´
6B-U3-F	TCAACGACAACGACGAAGAC
6B-U3-R	GACGCTCATCGTTTCTAGCC
6B-U12-F	CACGCTAAAGACAGCACGAA
6B-U12-R	ACCACATGAGCACAAAATCG
6B-U17-F	GGCATGTTATTGGGAGCATT
6B-U17-R	GCGACGATATCCCCTAACAA
6B-U18-F	CTGGGAATTCCAGCTGTGTT
6B-U18-R	CTCCTGCGCTATGACCTTCT
6B-U19-F	TGCCACTCAAACTGAAGACG
6B-U19-R	CACCGACCACTGTTGTATCG
6B-U22-F	TCGATGCGTTATCGAGACTG
6B-U22-R	CTTTCTTTTCGGCAGAATGC
6B-U29-F	CTTAGCGACCAAATGCAACA
6B-U29-R	AGCTCCTTGGAGGAGGAGAC
6B-U30-F	TGTCCATCCTCGACTTCCTC
6B-U30-R	GGGTAAGCATGAGCTTCTCG
6B-U31-F	CACCTAAAGGCGAAAATGGA
6B-U31-R	TTGGCTGCTTTGTTCATCAG
6B-U38-F	CAAGGAGTGCCTGTGGGTAT
6B-U38-R	GCTAAGGTGAGCCAGATTCG
6B-U39-F	GGATATTGTGGGTGGAGTGG
6B-U39-R	TAGGCGTCTTGACGACAGTG
6B-U42-F	TTCCATCACGCATAGACCAA
6B-U42-R	AGCGCGTTTTTCTTGTTGTT
6B-U43-F	GACCTACGGGCAAACAGAAG
6B-U43-R	CGTTGCGAAGTCTGCAAATA
6B-U48-F	CATATCGGACGAGAGCCATT
6B-U48-R	CGATTCTGTCGTGTTGATGG
6B-U51-F	CGGAGTTTTATGGCTGGGTA
6B-U51-R	GGCAAAGTCCAATGTCCACT
6B-U54-F	CGCATCAATTACTCGCAAGA
6B-U54-R	CGACCGTGGTTAGACTTGGT
6B-U57-F	AGGCGACCGAAATTTTACCT
6B-U57-R	GCAGTAGATTCCGAGCAAGG
6B-U64-F	TGCACCGAGAAATAGTGCTG
6B-U64-R	CTGCCTTTAAGCCTCTGACG
6B-U73-F	TGGGAAAGTTCAGAGCGACT
6B-U73-R	AAAACTCTTCGGCAGCACAT
6B-U74-F	GCTTTATTCGATGCGGTGAT
6B-U74-R	GCGCGAAATTTCCATACACT
6B-U77-F	TGTCGCGTGCAAAACTAAAG

Název	Sekvence od 5´ do 3´
6A-U75-R	TAGGGCTGGAAAGAGAACGA
6A-U77-F	AACGGTGGATTACGCCACTG
6A-U77-R	TTATTCGGGTCGGTTACTCG
6A-U82-F	GAATCCTGCTAAAGGCGTCA
6A-U82-R	AGAATTGTAGGGCGGGAACT
6A-U83-F	ACGAGAAAACGTCTGCGACT
6A-U83-R	GGTTGACGATCCGTTCTCAT
6A-U86-F	ACAAAAACAAGGACCGCAAG
6A-U86-R	ACCGTCGATGATTGAACACA
6A-U94-F	CTGCAAAGTGGTACGCTCAA
6A-U94-R	GCATACGTGCACCAATCATC
6A-U95-F	AGTATCGCCAAGCCAAGAGA
6A-U100-F	TGCGCCCGTTAATATAGAGG
6A-U100-R	AACACCATTCGAAACCTTGC

Název	Sekvence od 5´do 3´
6B-U77-R	CGGAACAATTCCGTTCTCAT
6B-U82-F	AAATTGCACGAGATCCGAAG
6B-U82-R	CGAGATTCTGGGTCCCCTAT
6B-U83-F	TGCGGCATATATTGGTATGG
6B-U83-R	ACATCGAGCCCTGCTCTAAA
6B-U86-F	AAACTCCAACGGACACCAAG
6B-U86-R	TCACTGTTGTTGGGGGATTT
6B-U94-F	CTGCAAAGTGGTACGCTCAA
6B-U94-R	GCATACGTGCACCAATCATC
6B-U95-F	CAAGAAAGGCGAAAAGTTGC
6B-U95-R	CTCTTGGCTTGGCGATAGTC
6B-U100-F	CAATGGCACATGTTGTCCTC
6B-U100-R	AACGTGAACACCATTCGTGA

10.6 Příloha 6 – Soupis onemocnění

230 dětských pacientů s maligním onemocněním léčených na Klinice dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FN Motol

Název maligního onemocnění	kód MNK	Počet osob
Hepatoblastom	C22.2	3
Nádory kostí a chrupavky končetin	C40.*	16
Nádory kostí a chrupavky v těle mimo končetiny	C41. *	6
Nádory periferních nervů a autonomního nervového systému	C47. *	7
Nádory retroperitonea a peritonea	C48.0	1
Měkkotkáňové nádory	C49. *	9
Nádory varlat	C62.9	2
Nádory ledvin s výjmkou ledvinné pánvičky	C64. *	1
Nádory sítnice	C69.2	2
Nádory CNS	C71. *	9
Nádory pánve a hrudníku	C76. *	2
Hodkinův lymfom	C81. *	30
NHL-folikulární lymfom	C82.2	1
NHL-non-folikulární lymfom	C83. *	28
jiný, nespecifikovaný NHL	C85. *	2
ALL	C91. *	85
AML	C92. *	17
MDS	D46. *	8
Chromická myelofibróza	D47. *	1
Celkem		230

Rozdělení diagnóz u dětských pacientů dle Mezinárodní klasifikace nemocí.
* značí jakékoli další možné číslo.

345 dospělých pacientů léčených na Ústavuhematologie a krevní transfúze

Název maligního onemocnění	**kód MNK**	**Počet osob**
Hodgkinův lymfom	C81.*	3
NHL-folikulární lymfom	C82.*	6
NHL-non-foliculární lymfom	C83.*	9
Zralé T/NK lymfomy	C84.*	4
Jiný, nespecifikovaný NHL	C85.*	5
Maligní imunoproliferativní nemoci a jisté další typy B buněčných lymfomů	C88.0	1
Mnohočetný myelom	C90.0	3
ALL	C91.*	82
AML	C92.*	141
Akutní monoblastická/monocytoidní leukémie	C93.*	3
Jiné leukémie ze specifických buněk	C94.0	2
Leukémie nespecifikovaných buněčných typů	C95.*	6
Histiocytóza z Langerhansových buněk	C96.1	1
Polycytemia vera	D45	2
Myelodysplastický syndrom	D46.*	48
Další nádorová onemocnění nejistého chování z lymfatické/hematopoetické tkáně (zejména chronická myeloproliferativní nemoc)	D47.*	29
Celkem		345

Rozdělení diagnóz u dětských pacientů dle Mezinárodní klasifikace nemocí.
* značí jakékoli další možné číslo.

10.7 Příloha 7 – Informovaný souhlas

Informovaný souhlas s poskytnutím vzorku nehtů pro studii chromozomálně integrovaného HHV-6

Vážený pane, Vážená paní,

v rámci lékařského výzkumu zkoumáme problematiku virových infekcí daných šestým lidským herpesvirem (HHV6-Human Herpesvirus 6). Tento virus je běžně u dětí příčinou lehké dětské exantémové nemoci (Šestá exantémová nemoc), která v průběhu několika dnů vyšších teplot a následného prchavého exantému sama odezní. U těžce imunosuprimovaných pacientů (dětských i dospělých), jako jsou například pacienti léčení pro nádorové onemocnění, či pacienti po transplantacích, je však tento virus popisován i jako příčina závažnějších zdravotních komplikací (zápaly plic, hepatitidy apod.).

V poslední době jsou také popsány případy integrace genetické informace tohoto viru přímo do lidských chromosomů všech buněk těla u přibližně 1-2% populace. Tento stav sice dovolí genetickou informaci viru detekovat, ale je pro pacienta z dosud známých faktů biologicky zcela bez významu. Přes to se zdá, že alespoň některé virové proteiny jsou v tomto stavu tvořeny a mohou tedy nějak ovlivňovat organismus nositele. Potenciální nebezpečí pro nositele leží z pohledu chromosomálně integrovaného HHV6 tedy především v detekování přítomné virové genetické informace ve vysoké kvantitě, která je u většiny imunosuprimovaných pacientů příznakem aktivní infekce s nutností léčby virostatickými léky s potenciálně nebezpečnými nežádoucími účinky.

Protože se snažíme se o chromosomálně integrovaném HHV6 a jeho biologickém chování dozvědět co nejvíce, abychom zabránili možným závažným nežádoucím účinkům virostatické terapie, chtěli bychom Vás požádat o souhlas s vyšetřením nehtů Vašich, či Vašeho dítěte na přítomnost genetické informace HHV6. S případným pozitivním výsledkem budete seznámeni.

Váš případný nesouhlas plně respektujeme a v žádném případě neovlivní poskytovanou lékařskou péči. Přečetl jsem a porozuměl předloženému textu.

Souhlasím s využitím vzorků odebraných mně (mému dítěti) k výzkumu za výše uvedených podmínek

V _____ dne _____

Podpis: Podpis zákonného zástupce

(u osob mladších 18-ti let)

_____ _____

10.8 Příloha 8 – Návody

10.8.1 QIAamp DNA Blood Mini Kit

Important Notes Before Starting

Preparation of reagents

1. **QIAGEN Protease stock solution (store at 2–8°C or –20°C)**

   When using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (50), pipet 1.2 ml protease solvent* (nuclease-free water containing 0.04% sodium azide) into the vial containing lyophilized QIAGEN Protease, as indicated on the label. When using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (250), pipet 5.5 ml protease solvent into the vial containing lyophilized QIAGEN Protease, as indicated on the label.

   Dissolved QIAGEN Protease is stable for up to 2 months when stored at 2–8°C. Storage at –20°C is recommended to prolong the life of QIAGEN Protease, but repeated freezing and thawing should be avoided. For this reason, storage of aliquots of QIAGEN Protease is recommended.

2. **Buffer AL† (store at room temperature, 15–25°C)**

   Mix Buffer AL thoroughly by shaking before use. Buffer AL is stable for 1 year when stored at room temperature.

   Note: Do not add QIAGEN Protease or Proteinase K directly to Buffer AL.

3. **Buffer AW1† (store at room temperature, 15–25°C)**

   Buffer AW1 is supplied as a concentrate. Before using for the first time, add the appropriate amount of ethanol (96–100%) as indicated on the bottle and in Table 7.

   Buffer AW1 is stable for 1 year when stored closed at room temperature.

Table 7. Preparation of Buffer AW1

Kit size	AW1 concentrate (ml)	Ethanol (ml)	Final volume (ml)
50	19	25	44
250	95	125	220

4. **Buffer AW2* (store at room temperature, 15–25°C)**

   Buffer AW2 is supplied as a concentrate. Before using for the first time, add the appropriate amount of ethanol (96–100%) to Buffer AW2 concentrate as indicated on the bottle and in Table 8, page 25.

   Buffer AW2 is stable for 1 year when stored closed at room temperature.

** Contains sodium azide as a preservative. When working with chemicals, always wear a suitable lab coat, disposable gloves, and protective goggles. For more information, consult the appropriate material safety data sheets (MSDSs), available from the product supplier.*

† Contains chaotropic salt, which is an irritant. Take appropriate laboratory safety measures and wear gloves when handling. Not compatible with disinfecting agents containing bleach.

Blood and Body Fluid Vacuum Protocol

Things to do before starting:

- Equilibrate samples to room temperature (15–25°C).
- Heat a water bath or heating block to 56°C for use in step 4.
- Equilibrate Buffer AE or distilled water to room temperature for elution in step 11.
- Ensure that Buffer AW1, Buffer AW2, and QIAGEN Protease have been prepared according to the instructions on page 24.
- If a precipitate has formed in Buffer AL, dissolve by incubating at 56°C.
- All centrifugation steps should be carried out at room temperature.
- For setup of the QIAvac 24, see pages 18–20. For setup of the QIAvac 6S, see pages 21–23.
- Switch off vacuum between steps to ensure that a consistent, even vacuum is applied during protocol steps.
- Use carrier DNA if the sample contains <10,000 genome equivalents (see page 9).
- 200 µl of whole blood yields 3–12 µg of DNA.

1. **Pipet 20 µl QIAGEN Protease (or Proteinase K) into the bottom of a 1.5 ml microcentrifuge tube.**
2. **Add 200 µl sample to the microcentrifuge tube. Use up to 200 µl whole blood, plasma, serum, or body fluids, or up to 5 x 10^6 lymphocytes in 200 µl PBS.**

   If the sample volume is less than 200 µl, add the appropriate volume of PBS.

   QIAamp Spin Columns copurify RNA and DNA when both are present in the sample. RNA may inhibit some downstream enzymatic reactions, but not PCR. If RNA-free genomic DNA is required, 4 µl of an RNase A stock solution (100 mg/ml) should be added to the sample before addition of Buffer AL.

   Note: It is possible to add QIAGEN Protease (or Proteinase K) to samples that have already been dispensed into microcentrifuge tubes. In this case, it is important to ensure proper mixing after adding the enzyme.
3. **Add 200 µl Buffer AL to the sample. Mix by pulse-vortexing for 15 s.**

   In order to ensure efficient lysis, it is essential that the sample and Buffer AL are mixed thoroughly to yield a homogeneous solution.

   If the sample volume is larger than 200 µl, increase the amount of QIAGEN Protease (or Proteinase K) and Buffer AL proportionally; e.g., a 400 µl sample will require 40 µl QIAGEN Protease (or Proteinase K) and 400 µl Buffer AL. If sample volumes larger than 400 µl are required, use of QIAamp DNA Blood Midi or Maxi Columns is recommended; these can process up to 2 ml or up to 10 ml of sample, respectively.

   Note: Do not add QIAGEN Protease or Proteinase K directly to Buffer AL.

4. **Incubate at 56°C for 10 min.**

   DNA yield reaches a maximum after lysis for 10 min at 56°C. Longer incubation times have no effect on yield or quality of the purified DNA.
5. **Briefly centrifuge the 1.5 ml microcentrifuge tube to remove drops from the inside of the lid.**
6. **Add 200 µl ethanol (96–100%) to the sample, and mix again by pulse-vortexing for 15 s. After mixing, briefly centrifuge the 1.5 ml microcentrifuge tube to remove drops from the inside of the lid.**

   If the sample volume is greater than 200 µl, increase the amount of alcohol proportionally; e.g., a 400 µl sample will require 400 µl of alcohol.
7. **Insert the QIAamp Spin Column into the VacConnector on the QIAvac vacuum manifold. Carefully apply the mixture from step 6 to the QIAamp Spin Column without wetting the rim. Switch on the vacuum pump. Be sure to leave the lid of the QIAamp Spin Column open while applying vacuum. After all lysates have been drawn through the spin column, switch off the vacuum pump.**

   The collection tube from the blister pack can be saved for the centrifugation in step 10.

   If at this stage all of the solution has not passed through the membrane, place the QIAamp Spin Column into a clean 2 ml collection tube (provided), close the cap, and centrifuge at 6000 x *g* (8000 rpm) for 3 min or until all the liquid has completely passed through. Place the QIAamp Spin Column into another clean 2 ml collection tube, and discard the tube containing the filtrate. Continue with step 8 of the spin protocol on page 28.
8. **Apply 750 µl Buffer AW1 to the QIAamp Spin Column without wetting the rim. Leave the lid of the Spin Column open and switch on the vacuum pump. After all of Buffer AW1 has been drawn through the spin column, switch off the vacuum pump.**
9. **Add 750 µl Buffer AW2 without wetting the rim of the QIAamp Spin Column. Leave the lid of the spin column open and switch on the vacuum pump. After all of Buffer AW2 has been drawn through the spin column, switch off the vacuum pump.**
10. **Close the lid of the QIAamp Spin Column, remove it from the vacuum manifold, and discard the VacConnector. Place the QIAamp Spin Column into a clean 2 ml collection tube and centrifuge at 20,000 x *g* (14,000 rpm) for 1 min to dry the membrane completely.**
11. **Place the QIAamp Spin Column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided). Discard the collection tube containing the filtrate. Carefully open the QIAamp Spin Column. Add 200 µl Buffer AE or distilled water equilibrated to room temperature. Incubate at room temperature for 1 min, and then centrifuge at 6000 x *g* (8000 rpm) for 1 min.**

    Incubating the QIAamp Spin Column loaded with Buffer AE or water for 5 min at room temperature before centrifugation generally increases DNA yield.

A second elution step with a further 200 µl Buffer AE will increase yields by up to 15%.

Volumes of more than 200 µl should not be eluted into a 1.5 ml microcentrifuge tube because the spin column will come into contact with the eluate, leading to possible aerosol formation during centrifugation.

Elution with volumes of less than 200 µl increases the final DNA concentration in the eluate significantly, but slightly reduces overall DNA yield (see Table 4, page 16). For samples containing less than 1 µg of DNA, elution in 50 µl Buffer AE or water is recommended. Eluting with 2 x 100 µl instead of 1 x 200 µl does not increase elution efficiency.

For long-term storage of DNA, eluting in Buffer AE and storing at –20°C is recommended, since DNA stored in water is subject to acid hydrolysis.

A 200 µl sample of whole human blood (~5 x 10^6 leukocytes/ml) typically yields 6 µg of DNA in 200 µl water (30 ng/µl) with an A_{260}/A_{280} ratio of 1.7–1.9.

For more information about elution and how to determine DNA yield, purity, and length, refer to pages 15–17.

Celý návod je ke k dispozici: http://www.qiagen.com/Products/Catalog/Sample-Technologies/DNA-Sample-Technologies/Genomic-DNA/QIAamp-DNA-Mini-Kit#resources

10.8.2 QIAamp DNA Micro Kit

Protocol: Isolation of Genomic DNA from Forensic Case Work Samples

This protocol is for isolation of genomic DNA from cigarette butts, envelopes, hair, nail clippings, stamps, or blood, saliva, or semen stains.

Important points before starting

- Perform all centrifugation steps at room temperature (15–25°C).
- Check whether carrier RNA is required (see pages 12 and 14).

Things to do before starting

- Equilibrate Buffer AE or distilled water for elution to room temperature (15–25°C).
- Set a thermomixer or heated orbital incubator to 56°C for use in step 2, and a second thermomixer or heated orbital incubator to 70°C for use in step 5. If thermomixers or heated orbital incubators are not available, heating blocks or water baths can be used instead.
- If Buffer AL or Buffer ATL contains precipitates, dissolve by heating to 70°C with gentle agitation.
- If processing semen stains, hair, or nail clippings, prepare an aqueous 1 M DTT (dithiothreitol) stock solution. Store aliquots at –20°C. Thaw immediately before use.
- Ensure that Buffers AW1 and AW2 have been prepared according to the instructions on page 13.
- Optional: If processing stained fabrics, QIAshredder Spin Columns may be required.

Procedure

1. **Lyse samples according to step 1a (cigarette butts), 1b (envelopes or stamps), 1c (hair roots), 1d (hair shafts without roots), 1e (nail clippings), or 1f (material stained with blood, saliva, or semen).**

1a. **Lysing cigarette butts:**

Cut out a 1 cm² piece of outer paper from the end of the cigarette or filter. Cut this piece into 6 smaller pieces. Transfer the pieces to a 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided).

Add 300 µl Buffer ATL and 20 µl Proteinase K, close the lid, and mix by pulse-vortexing for 10 s. Continue the procedure from step 2.

Forensic Case Work Samples

1b. **Lysing envelopes or stamps:**

Cut out a 0.5–2.5 cm² sample from the envelope or stamp, and then cut it into smaller pieces. Transfer the pieces to a 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided).

Note: Before cutting out the envelope or stamp sample, surface contamination can be reduced by using a swab moistened with distilled water.

Add 300 µl Buffer ATL and 20 µl Proteinase K, close the lid, and mix by pulse-vortexing for 10 s. Continue the procedure from step 2.

1c. **Lysing hair roots:**

Add 300 µl Buffer ATL, 20 µl Proteinase K, and 20 µl 1 M DTT to a 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided).

Cut off a 0.5–1 cm piece starting from the hair bulb and transfer it to the 1.5 ml microcentrifuge tube. Close the lid and mix by pulse-vortexing for 10 s. Continue the procedure from step 2.

1d. **Lysing hair shafts (without roots):**

Add 300 µl Buffer ATL, 20 µl Proteinase K, and 20 µl 1 M DTT to a 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided).

Cut the hair shaft into 0.5–1 cm pieces and transfer them to the 1.5 ml microcentrifuge tube. Close the lid and mix by pulse-vortexing for 10 s. Continue the procedure from step 2.

1e. **Lysing nail clippings:**

Transfer the nail clippings to a 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided).

Add 300 µl Buffer ATL, 20 µl Proteinase K, and 20 µl 1 M DTT, close the lid, and mix by pulse-vortexing for 10 s. Continue the procedure from step 2.

1f. **Lysing material stained with blood, saliva, or semen:**

Cut out up to 0.5 cm² of stained material and then cut it into smaller pieces. Transfer the pieces to a 2 ml microcentrifuge tube (not provided).

Add 300 µl Buffer ATL and 20 µl Proteinase K. If processing semen stains, add 20 µl 1 M DTT as well. Close the lid and mix by pulse-vortexing for 10 s. Continue the procedure from step 2.

2. **Place the tube in a thermomixer or heated orbital incubator, and incubate at 56°C with shaking at 900 rpm for at least 1 h.**

In general, hairs are lysed in 1 h. If necessary, increase the incubation time to ensure complete lysis.

If using a heating block or water bath, vortex the tube for 10 s every 10 min to improve lysis.

For larger samples of nail clippings, we recommend overnight incubation at 56°C. Any material that is not lysed during this incubation step or the incubation in step 5 will be pelleted during centrifugation in step 6.

Forensic Case Work Samples

3. **Briefly centrifuge the tube to remove drops from the inside of the lid.**
4. **Add 300 µl Buffer AL, close the lid, and mix by pulse-vortexing for 10 s.**

To ensure efficient lysis, it is essential that the sample and Buffer AL are thoroughly mixed to yield a homogeneous solution.

A white precipitate may form when Buffer AL is added to Buffer ATL. The precipitate does not interfere with the QIAamp procedure and will dissolve during incubation in step 5.

Note: If carrier RNA is required (see page 12), add 1 µg dissolved carrier RNA to 300 µl Buffer AL. Note that carrier RNA does not dissolve in Buffer AL. It must first be dissolved in Buffer AE and then added to Buffer AL.

5. **Place the tube in the thermomixer or heated orbital incubator, and incubate at 70°C with shaking at 900 rpm for 10 min.**

If using a heating block or water bath, vortex the tube for 10 s every 3 min to improve lysis.

6. **Centrifuge the tube at full speed (20,000 x *g*; 14,000 rpm) for 1 min.**
7. **Carefully transfer the supernatant from step 6 to the QIAamp MinElute Column without wetting the rim.**

Lysate remaining in solid sample material (e.g., denim) can be harvested by transferring the material to a QIAshredder Spin Column (not supplied) and centrifuging at full speed for 2 min. Transfer the flow-through to the QIAamp MinElute Column without wetting the rim.

8. **Close the lid, and centrifuge at 6000 x *g* (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute Column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.**

If the lysate has not completely passed through the membrane after centrifugation, centrifuge again at a higher speed until the QIAamp MinElute Column is empty.

9. **Carefully open the QIAamp MinElute Column and add 500 µl Buffer AW1 without wetting the rim. Close the lid and centrifuge at 6000 x *g* (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute Column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.**

Forensic Case Work Samples

10. **Carefully open the QIAamp MinElute Column and add 500 µl Buffer AW2 without wetting the rim. Close the lid and centrifuge at 6000 x *g* (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute Column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.**

Contact between the QIAamp MinElute Column and the flow-through should be avoided. Some centrifuge rotors may vibrate upon deceleration, resulting in the flow-through, which contains ethanol, coming into contact with the QIAamp MinElute Column. Take care when removing the QIAamp MinElute Column and collection tube from the rotor, so that flow-through does not come into contact with the QIAamp MinElute Column.

11. **Centrifuge at full speed (20,000 x *g*; 14,000 rpm) for 3 min to dry the membrane completely.**

This step is necessary, since ethanol carryover into the eluate may interfere with some downstream applications.

12. **Place the QIAamp MinElute Column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided) and discard the collection tube containing the flow-through. Carefully open the lid of the QIAamp MinElute Column and apply 20–50 µl Buffer AE or distilled water to the center of the membrane.**

If high pH or EDTA affects sensitive downstream applications, use water for elution (see page 11).

Important: Ensure that Buffer AE or distilled water is equilibrated to room temperature (15–25°C). Dispense Buffer AE or distilled water onto the center of the membrane to ensure complete elution of bound DNA.

QIAamp MinElute Columns provide flexibility in the choice of elution volume. Choose a volume according to the requirements of the downstream application. Remember that the volume of eluate will be up to 5 µl less than the volume of elution solution applied to the column.

13. **Close the lid and incubate at room temperature (15–25°C) for 1 min. Centrifuge at full speed (20,000 x *g*; 14,000 rpm) for 1 min.**

Incubating the QIAamp MinElute Column loaded with Buffer AE or water for 5 min at room temperature before centrifugation generally increases DNA yield.

Forensic Case Work Samples

Celý návod je ke k dispozici:http://www.qiagen.com/Products/Catalog/Sample-Technologies/DNA-Sample-Technologies/Genomic-DNA/QIAamp-DNA-Micro-Kit#resources

10.8.3 Plasmid mini kit

Protocol: Plasmid or Cosmid DNA Purification using QIAGEN Plasmid Mini Kit

This protocol is designed for preparation of up to 20 µg of high-copy plasmid or cosmid DNA using the QIAGEN Plasmid Mini Kit. For additional protocols, such as for cosmid, low-copy-number plasmid, BACs, PACs, P1s, and double-stranded M13 replicative form purification, see the recommendations at www.qiagen.com/goto/plasmidinfo.

Important notes before starting

- New users are advised to familiarize themselves with the detailed protocol provided in this handbook. In addition, extensive background information is provided on our plasmid resource page www.qiagen.com/goto/plasmidinfo.
- **Optional**: Remove samples at indicated steps to monitor the procedure on an analytical gel (see page 41)

Things to do before starting

- Add the provided RNase A solution to Buffer P1 before use. Use 1 vial RNase A (centrifuge briefly before use) per bottle Buffer P1 for final concentration of 100 µg/ml.
- Check Buffer P2 for SDS precipitation due to low storage temperatures. If necessary, dissolve the SDS by warming to 37°C.
- Pre-chill Buffer P3 at 4°C.
- **Optional**: Add the provided LyseBlue reagent to Buffer P1 and mix before use. Use 1 vial LyseBlue reagent per bottle Buffer P1 for a final dilution of 1:1000 (e.g., 10 µl LyseBlue into 10 ml Buffer P1). LyseBlue provides visual identification of optimum buffer mixing thereby preventing the common handling errors that lead to inefficient cell lysis and incomplete precipitation of SDS, genomic DNA, and cell debris. For more details see "Using LyseBlue reagent" on page 14.

Procedure

1. **Pick a single colony from a freshly streaked selective plate and inoculate a starter culture of 2–5 ml LB medium containing the appropriate selective antibiotic. Incubate for approximately 8 h at 37°C with vigorous shaking (approx. 300 rpm).**

   Use a tube or flask with a volume of at least 4 times the volume of the culture.

2. **Dilute the starter culture 1/500 to 1/1000 into 3 ml selective LB medium. Grow at 37°C for 12–16 h with vigorous shaking (approx. 300 rpm).**

   Use a flask or vessel with a volume of at least 4 times the volume of the culture. The culture should reach a cell density of approximately 3–4 x 10^9 cells per milliliter, which typically corresponds to a pellet wet weight of approximately 3 g/liter medium.

3. **Harvest the bacterial cells by centrifugation at 6000 x *g* for 15 min at 4°C.**

   ⊗ If you wish to stop the protocol and continue later, freeze the cell pellets at –20°C.

4. **Resuspend the bacterial pellet in 0.3 ml of Buffer P1.**

   Ensure that RNase A has been added to Buffer P1.

   If LyseBlue reagent has been added to Buffer P1, vigorously shake the buffer bottle before use to ensure LyseBlue particles are completely resuspended. The bacteria should be resuspended completely by vortexing or pipetting up and down until no cell clumps remain.

5. **Add 0.3 ml of Buffer P2, mix thoroughly by vigorously inverting the sealed tube 4–6 times, and incubate at room temperature (15–25°C) for 5 min.**

   Do not vortex, as this will result in shearing of genomic DNA. The lysate should appear viscous. Do not allow the lysis reaction to proceed for more than 5 min. After use, the bottle containing Buffer P2 should be closed immediately to avoid acidification from CO_2 in the air.

   If LyseBlue has been added to Buffer P1, the cell suspension will turn blue after addition of Buffer P2. Mixing should result in a homogeneously colored suspension. If the suspension contains localized colorless regions or if brownish cell clumps are still visible, continue mixing the solution until a homogeneously colored suspension is achieved.

6. **Add 0.3 ml of chilled Buffer P3, mix immediately and thoroughly by vigorously inverting 4–6 times, and incubate on ice for 5 min.**

   Precipitation is enhanced by using chilled Buffer P3 and incubating on ice. After addition of Buffer P3, a fluffy white material forms and the lysate becomes less viscous. The precipitated material contains genomic DNA, proteins, cell debris, and KDS. The lysate should be mixed thoroughly to ensure even potassium dodecyl sulphate precipitation. If the mixture still appears viscous, more mixing is required to completely neutralize the solution.

   If LyseBlue reagent has been used, the suspension should be mixed until all trace of blue has gone and the suspension is colorless. A homogeneous colorless suspension indicates that the SDS has been effectively precipitated.

7. **Centrifuge at maximum speed in a microcentrifuge for 10 min. Remove supernatant containing plasmid DNA promptly.**

   Before loading the centrifuge, the sample should be mixed again. Centrifugation should be performed at maximum speed in 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tubes (e.g., 10,000–13,000 rpm in a microcentrifuge). Maximum speed corresponds to 14,000–18,000 x *g* for most microcentrifuges. After centrifugation, the supernatant should be clear. If the supernatant is not clear, a second, shorter centrifugation should be carried out to avoid applying any suspended or particulate material to the column. Suspended material (which causes the sample to appear turbid) will clog the column and reduce or eliminate flow.

   Optional: Remove a 50 µl sample from the cleared lysate and save it for an analytical gel (sample 1).

8. **Equilibrate a QIAGEN-tip 20 by applying 1 ml Buffer QBT, and allow the column to empty by gravity flow.**

   Place QIAGEN-tips into a QIArack over the waste tray or use the tip holders provided with each kit (see "Setup of QIAGEN-tips" page 13). Flow of buffer will begin automatically by reduction in surface tension due to the presence of detergent in the equilibration buffer. Allow the QIAGEN-tip to drain completely. QIAGEN-tips can be left unattended, since the flow of buffer will stop when the meniscus reaches the upper frit in the column.

9. **Apply the supernatant from step 7 to the QIAGEN-tip 20 and allow it to enter the resin by gravity flow.**

   The supernatant should be loaded onto the QIAGEN-tip promptly. If it is left too long and becomes cloudy due to further precipitation of protein, it must be centrifuged again before loading to prevent clogging of the QIAGEN-tip.

   Optional: Remove a 50 µl sample of the flow-through and save for an analytical gel (sample 2).

10. **Wash the QIAGEN-tip 20 with 2 x 2 ml Buffer QC.**

    Allow Buffer QC to move through the QIAGEN-tip by gravity flow.

    Optional: Remove a 220 µl sample of the combined wash fractions and save for an analytical gel (sample 3).

11. **Elute DNA with 0.8 ml Buffer QF.**

    Collect the eluate in a 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tubes (not supplied).

    Note: For constructs larger than 45–50 kb, prewarming the elution buffer to 65°C may help to increase yield.

    Optional: Remove a 45 µl sample of the eluate and save for an analytical gel (sample 4).

Plasmid Mini Kit

12. **Precipitate DNA by adding 0.7 volumes (0.56 ml per 0.8 ml of elution volume) of room-temperature isopropanol to the eluted DNA. Mix and centrifuge immediately at ≥15,000 x *g* rpm for 30 min in a microcentrifuge. Carefully decant the supernatant.**

    All solutions should be at room temperature to minimize salt precipitation. Isopropanol pellets have a glassy appearance and may be more difficult to see than the fluffy, salt-containing pellets that result from ethanol precipitation. Marking the outside of the tube before centrifugation allows the pellet to be easily located. Isopropanol pellets are also more loosely attached to the side of the tube, and care should be taken when removing the supernatant.

13. **Wash DNA pellet with 1 ml of 70% ethanol and centrifuge at 15,000 x *g* for 10 min. Carefully decant the supernatant without disturbing the pellet.**

    The 70% ethanol removes precipitated salt and replaces isopropanol with the more volatile ethanol, making the DNA easier to redissolve.

14. **Air-dry the pellet for 5–10 min, and redissolve the DNA in a suitable volume of buffer (e.g., TE buffer, pH 8.0, or 10mM Tris-Cl, pH 8.5)**

    Redissolve the DNA pellet by rinsing the walls to recover the DNA. Pipetting the DNA up and down to promote resuspension may cause shearing and should be avoided. Overdrying the pellet will make the DNA difficult to redissolve. DNA dissolves best under slightly alkaline conditions; it does not easily dissolve in acidic buffers.

Determination of yield

To determine the yield, DNA concentration should be determined by both UV spectrophotometry at 260 nm and quantitative analysis on an agarose gel. For reliable spectrophotometric DNA quantification, A_{260} readings should lie between 0.1 and 1.0.

Agarose gel analysis

We recommend removing and saving aliquots during the purification procedure (samples 1–4). If the plasmid DNA is of low yield or quality, the samples can be analyzed by agarose gel electrophoresis to determine the stage of the purification procedure where the problem occurred (see page 41).

Celý návod je ke k dispozici: http://www.qiagen.com/Products/Catalog/Sample-Technologies/DNA-Sample-Technologies/Plasmid-DNA/QIAGEN-Plasmid-Maxi-Kit#resources

10.8.4 Plasmid maxi kit

Protocol: Plasmid or Cosmid DNA Purification using QIAGEN Plasmid Midi and Maxi Kits

This protocol is designed for preparation of up to 100 µg of high- or low-copy plasmid or cosmid DNA using the QIAGEN Plasmid Midi Kit, or up to 500 µg using the QIAGEN Plasmid Maxi Kit. For additional protocols, such as for purification of very low-copy plasmids or cosmids of less than 10 copies per cell, see page 29 or visit www.qiagen.com/goto/plasmidinfo.

Low-copy plasmids that have been amplified in the presence of chloramphenicol should be treated as high-copy plasmids when choosing the appropriate culture volume.

Table 3. Maximum recommended culture volumes*

	QIAGEN-tip 100	QIAGEN-tip 500
High-copy plasmids	25 ml	100 ml
Low-copy plasmids	100 ml	500 ml

* For the QIAGEN-tip 100, the expected yields are 75–100 µg for high-copy plasmids and 20–100 µg for low-copy plasmids. For the QIAGEN-tip 500, the expected yields are 300–500 µg for high-copy plasmids and 100–500 µg for low-copy plasmids.

Important points before starting

- New users are advised to familiarize themselves with the detailed protocol provided in this handbook. In addition, extensive background information is provided on our plasmid resource page www.qiagen.com/goto/plasmidinfo.
- If working with low-copy vectors, it may be beneficial to increase the lysis buffer volumes to increase the efficiency of alkaline lysis, and thereby the DNA yield. In case additional Buffers P1, P2, and P3 are needed, their compositions are provided in Appendix B: Composition of Buffers, on page 44. Alternatively, the buffers may be purchased separately (see page 49).
- **Optional**: Remove samples at the indicated steps to monitor the procedure on an analytical gel (see page 41).
- Blue (marked with a ▲) denotes values for QIAGEN-tip 100 using the QIAGEN Plasmid Midi Kit; red (marked with a ●) denotes values for QIAGEN-tip 500 using the QIAGEN Plasmid Maxi Kit.

Things to do before starting

- Add the provided RNase A solution to Buffer P1 before use. Use 1 vial RNase A (centrifuge briefly before use) per bottle Buffer P1 for final concentration of 100 µg/ml.
- Check Buffer P2 for SDS precipitation due to low storage temperatures. If necessary, dissolve the SDS by warming to 37°C.
- Pre-chill Buffer P3 at 4°C.
- **Optional**: Add the provided LyseBlue reagent to Buffer P1 and mix before use. Use 1 vial LyseBlue reagent per bottle Buffer P1 for a final dilution of 1:1000 (e.g., 10 µl LyseBlue into 10 ml Buffer P1). LyseBlue provides visual identification of optimum buffer mixing thereby preventing the common handling errors that lead to inefficient cell lysis and incomplete precipitation of SDS, genomic DNA, and cell debris. For more details see "Using LyseBlue reagent" on page 14.

Procedure

1. **Pick a single colony from a freshly streaked selective plate and inoculate a starter culture of 2–5 ml LB medium containing the appropriate selective antibiotic. Incubate for approx. 8 h at 37°C with vigorous shaking (approx. 300 rpm).**

   Use a tube or flask with a volume of at least 4 times the volume of the culture.
2. **Dilute the starter culture 1/500 to 1/1000 into selective LB medium. For high-copy plasmids, inoculate ▲ 25 ml or ● 100 ml medium with ▲ 25–50 µl or ● 100–200 µl of starter culture. For low-copy plasmids, inoculate ▲ 100 ml or ● 500 ml medium with ▲ 100–200 µl or ● 250–500 µl of starter culture. Grow at 37°C for 12–16 h with vigorous shaking (approx. 300 rpm).**

   Use a flask or vessel with a volume of at least 4 times the volume of the culture. The culture should reach a cell density of approximately 3–4 x 10^9 cells per milliliter, which typically corresponds to a pellet wet weight of approximately 3 g/liter medium.
3. **Harvest the bacterial cells by centrifugation at 6000 x *g* for 15 min at 4°C.**

   ⊛ If you wish to stop the protocol and continue later, freeze the cell pellets at –20°C.
4. **Resuspend the bacterial pellet in ▲ 4 ml or ● 10 ml Buffer P1.**

   For efficient lysis, it is important to use a vessel that is large enough to allow complete mixing of the lysis buffers. Ensure that RNase A has been added to Buffer P1.

   If LyseBlue reagent has been added to Buffer P1, vigorously shake the buffer bottle before use to ensure LyseBlue particles are completely resuspended. The bacteria should be resuspended completely by vortexing or pipetting up and down until no cell clumps remain.
5. **Add ▲ 4 ml or ● 10 ml Buffer P2, mix thoroughly by vigorously inverting the sealed**

tube 4–6 times, and incubate at room temperature (15–25°C) for 5 min.

Do not vortex, as this will result in shearing of genomic DNA. The lysate should appear viscous. Do not allow the lysis reaction to proceed for more than 5 min. After use, the bottle containing Buffer P2 should be closed immediately to avoid acidification from CO_2 in the air.

If LyseBlue has been added to Buffer P1, the cell suspension will turn blue after addition of Buffer P2. Mixing should result in a homogeneously colored suspension. If the suspension contains localized colorless regions or if brownish cell clumps are still visible, continue mixing the solution until a homogeneously colored suspension is achieved.

6. **Add ▲ 4 ml or ● 10 ml of chilled Buffer P3, mix immediately and thoroughly by vigorously inverting 4–6 times, and incubate on ice for ▲ 15 min or ● 20 min.**

   Precipitation is enhanced by using chilled Buffer P3 and incubating on ice. After addition of Buffer P3, a fluffy white material forms and the lysate becomes less viscous. The precipitated material contains genomic DNA, proteins, cell debris, and KDS. The lysate should be mixed thoroughly to ensure even potassium dodecyl sulfate precipitation. If the mixture still appears viscous, more mixing is required to completely neutralize the solution.

   If LyseBlue reagent has been used, the suspension should be mixed until all trace of blue has gone and the suspension is colorless. A homogeneous colorless suspension indicates that the SDS has been effectively precipitated.
7. **Centrifuge at ≥20,000 x *g* for 30 min at 4°C. Remove supernatant containing plasmid DNA promptly.**

   Before loading the centrifuge, the sample should be mixed again. Centrifugation should be performed in non-glass tubes (e.g., polypropylene). After centrifugation the supernatant should be clear.

   Note: Instead of centrifugation steps 7 and 8, the lysate can be efficiently cleared by filtration using a QIAfilter Kits or Cartridges (see www.qiagen.com/products/plasmid/LargeScaleKits).

8. **Centrifuge the supernatant again at ≥20,000 x *g* for 15 min at 4°C. Remove supernatant containing plasmid DNA promptly.**

   This second centrifugation step should be carried out to avoid applying suspended or particulate material to the QIAGEN-tip. Suspended material (causing the sample to appear turbid) can clog the QIAGEN-tip and reduce or eliminate gravity flow.

   Optional: Remove a ▲ 240 µl or ● 120 µl sample from the cleared lysate supernatant and save for an analytical gel (sample 1) to determine whether growth and lysis conditions were optimal.
9. **Equilibrate a ▲ QIAGEN-tip 100 or ● QIAGEN-tip 500 by applying ▲ 4 ml or ● 10 ml Buffer QBT, and allow the column to empty by gravity flow.**

   Flow of buffer will begin automatically by reduction in surface tension due to the presence of detergent in the equilibration buffer. Allow the QIAGEN-tip to drain completely. QIAGEN-tips can be left unattended, since the flow of buffer will stop when the meniscus reaches the upper frit in the column.
10. **Apply the supernatant from step 8 to the QIAGEN-tip and allow it to enter the resin by gravity flow.**

    The supernatant should be loaded onto the QIAGEN-tip promptly. If it is left too long and becomes cloudy due to further precipitation of protein, it must be centrifuged again or filtered before loading to prevent clogging of the QIAGEN-tip.

    Optional: Remove a ▲ 240 µl or ● 120 µl sample from the flow-through and save for an analytical gel (sample 2) to determine the efficiency of DNA binding to the QIAGEN resin.
11. **Wash the QIAGEN-tip with ▲ 2 x 10 ml or ● 2 x 30 ml Buffer QC.**

    Allow Buffer QC to move through the QIAGEN-tip by gravity flow. The first wash is sufficient to remove contaminants in the majority of plasmid DNA preparations. The second wash is especially necessary when large culture volumes or bacterial strains producing large amounts of carbohydrates are used.

    Optional: Remove a ▲ 400 µl or ● 240 µl sample from the combined wash fractions and save for an analytical gel (sample 3).
12. **Elute DNA with ▲ 5 ml or ● 15 ml Buffer QF.**

    Collect the eluate in a 15 ml or 50 ml tube (not supplied). Use of polycarbonate centrifuge tubes is not recommended as polycarbonate is not resistant to the alcohol used in subsequent steps.

    Note: For constructs larger than 45–50 kb, prewarming the elution buffer to 65°C may help to increase yield.

    Optional: Remove a ▲ 100 µl or ● 60 µl sample of the eluate and save for an analytical gel (sample 4).

    ⊛ If you wish to stop the protocol and continue later, store the eluate at 4°C. Storage periods longer than overnight are not recommended.

13. **Precipitate DNA by adding ▲ 3.5 ml or ● 10.5 ml (0.7 volumes) room-temperature isopropanol to the eluted DNA. Mix and centrifuge immediately at ≥15,000 x *g* for 30 min at 4°C. Carefully decant the supernatant.**

    All solutions should be at room temperature to minimize salt precipitation, although centrifugation is carried out at 4°C to prevent overheating of the sample. Alternatively, disposable conical bottom centrifuge tubes can be used for centrifugation at 5000 x *g* for 60 min at 4°C. Isopropanol pellets have a glassy appearance and may be more difficult to see than the fluffy, salt-containing pellets that result from ethanol precipitation. Marking the outside of the tube before centrifugation allows the pellet to be more easily located. Isopropanol pellets are also more loosely attached to the side of the tube, and care should be taken when removing the supernatant.

14. **Wash DNA pellet with ▲ 2 ml or ● 5 ml of room-temperature 70% ethanol, and centrifuge at ≥15,000 x *g* for 10 min. Carefully decant the supernatant without disturbing the pellet.**

    Alternatively, disposable conical-bottom centrifuge tubes can be used for centrifugation at 5000 x *g* for 60 min at 4°C. The 70% ethanol removes precipitated salt and replaces isopropanol with the more volatile ethanol, making the DNA easier to redissolve.

15. **Air-dry the pellet for 5–10 min, and redissolve the DNA in a suitable volume of buffer (e.g., TE buffer, pH 8.0, or 10 mM Tris-Cl, pH 8.5).**

    Redissolve the DNA pellet by rinsing the walls to recover the DNA, especially if glass tubes have been used. Pipetting the DNA up and down to promote resuspension may cause shearing and should be avoided. Overdrying the pellet will make the DNA difficult to redissolve. DNA dissolves best under slightly alkaline conditions; it does not easily dissolve in acidic buffers.

Determination of yield

To determine the yield, DNA concentration should be determined by both UV spectrophotometry at 260 nm and quantitative analysis on an agarose gel. For reliable spectrophotometric DNA quantification, A_{260} readings should lie between 0.1 and 1.0.

Agarose gel analysis

We recommend removing and saving aliquots during the purification procedure (samples 1–4). If the plasmid DNA is of low yield or quality, the samples can be analyzed by agarose gel electrophoresis to determine the stage of the purification procedure where the problem occurred (see page 41).

Plasmid Midi and Maxi Kits

QIAGEN Plasmid Purification Handbook 04/2012 21

Celý návod je ke k dispozici: http://www.qiagen.com/Products/Catalog/Sample-Technologies/DNA-Sample-Technologies/Plasmid-DNA/QIAGEN-Plasmid-Maxi-Kit#resources

10.8.5 Lympho grow

1. Nechte roztát potřebné množství LymphoGrow a vytemperujte na pokojovou teplotu.
2. Sterilně přeneste 0,5 ml heparinizované plné krve do zkumavky.
3. Zamíchejte a inkubujte kultury při 37ºC v 5% CO_2 atmosféře v inkubátoru 48 až 72 hodin (zkumavky musejí ležet horizontálně).
4. 1-2 h před koncem inkubace přidejte 0,1 ml Colcemidu (na finální koncentraci 0,1 µg/ml)
5. Centrifugujte (5 minut při 500 g)
6. Vylijte téměř všechen supernatant (nechte jen pár kapek na dně).
7. Přidejte 5-10 ml KCl 0,075 M předehřáté na 37ºC (průběžně míchejte)
8. 10 minut inkubujte při pokojové teplotě
9. Centrifugujte (5 min při 500 g)
10. Přidejte 5-8 ml fixativa (čerstvě přepravené 3 díly methanolu a 1 díl kyseliny octové)
11. Opakujte kroky 9 a 10 dvakrát.
12. Resuspendujte buněčný pelet v malém objemu čerstvého fixativa.

Pokud potřebujete uschovat buněčný pelet, doporučujeme zkumavku pečlivě uzavřít a zmrazit na –20ºC .

Pro karyotypizaci postupujte dle svého osvědčeného protokolu.

Pouze pro použití v in vitro diagnostice

NENÍ určeno pro humánní ani veterinární terapeutické účely. Použití jiné, než doporučené, může být v rozporu s místními zákony.

Výrobce: CytoGen GmbH, Bienenweg 28, D-35764 Sinn, Německo

Bienenweg 28, D – 35764 Sinn, Germany
Tel. +49 – 2772 - 57 20 587
Fax +49 – 2772 – 570 945
E-Mail: CytoGen@Eurobiz.de
Web: www.CytoGen.Info

Celý návod je ke k dispozici: http://www.pentagen.cz/files/download/cytogen/LymphoGrow_Navod.pdf

11 Seznam zkratek

CCL	cytokin, signalizační chemokin produkován především v zánětlivých procesech
CCR	receptor cytokinu, charakteristický cysteinovými doménami
CD134	receptor vystavený na nezralých T lymfocytech, zprostředkovává buněčnou vazbu s HHV-6B
CD3	tvoří komplex s T-buněčným receptorem (TCR) a váže se na MHC
CD4	receptor zprostředkovávající vazbu mezi lymfocytem a antigenem vystaveným na na MHC II komlexech, zprostředkovává Th odpověď imunitního systému
CD46	protein působící jako kofaktor při inaktivaci komplementu, zprostředkovává buněčnou vazbu pro šestý lidský herpesvirus
CD8	receptor zprostředkovávající vazbu mezi cytotoxickým T lymfocytem a antigenem vystaveným na na MHC I komlexech
Ci-HHV-6	chromozomálně integrovaný šestý lidský herpesvirus
DR1-DR7	konečné virové sekvence, zahrnující v sobě opakující se sekvence
FISH	fluorescenční hybridizace *in situ*
gB	glykoprotein B je uvolněn do extracelulárního prostoru při prostupu virové partikule buněčnou membránou
gH	glykoprotein H zprostředkovávající vazbu mezi buněčným receptorem a virovou partikulí
gH, gL, gQ, gB	glykoproteinový vazebný komplex typický pro herpesviry
GRIM-19	regulační protein pro řízenou buněčnou smrt
H6LT I a II	latentní transkripty typické pro šestý lidský herpesvirus
HL	Hodgkinův lymfom
HHV-6	šestý lidský herpesvirus
HSCT	transplantace hematopoetických kmenových buněk
IE1 a IE2	virové proteiny brzké rané fáze
IEA a IEB	oblasti ve virovém genomu kódující proteiny brzké rané fáze
IFN	interferony jsou cytokiny, alfa a beta zprostředkovávají Th1 a gama Th2 odpověď imunitního systému
IgG	imunoglobulin třídy G (glykoprotein), monomer, adheruje fagocyt k fagocytujícímu objektu, chrání fetus a novorozence, který nemá vyvinutou vlastní obranyschopnost
IgM	imunoglobulin třídy M (glykoprotein) skládá se z 5-6 monomerů, opsonizuje antigeny, podílí se na neutralizaci virů
IL10	interleukin 10 je hlavní tlumivý cytokin, tlumí sekreci IL2 a IL10, podporuje tvorbu B-lymfocytů, jeho sekrece vede k Th2 protilátkové odpovědi
IL12	interleukin 12 jeho sekrece směruje imunitní odpověď k Th1 především makrofágové odpovědi
IL18	interleukin 18 stimuluje tvorbu INF-gama a IL2
IL2	interleukin 2 základní růstový faktor T-lymfocytů
ISG	buněčný gen zapojený do zvýšené produkce cytokinů

ISGF3	faktor nezbytný k aktivaci genu ISG
NF-kappaB	skupina transkripčních faktorů ovlivňující přepis genů důležitých pro imunitu a buněčnou smrt
PBMC	jaderné buňky periferní krve (lymfocyty, monocyty, makrofágy)
PCR	polymerázová řetězová reakce
R1-R3	středové repetice v genomu HHV-6
RANTES	chemokin regulující protivirovou odpověď
RQ-PCR	polymerázová řetězová reakce s fluorescečně značenou sondou, signál je snímán v "reálném čase"
RT-PCR	reverzní polymerázová řetězová reakce
TCR	T buněčný receptor společně s CD3 tvoří komplex pro navázání antigenu
Th1	zánětlivé T-lymfocyty
Th2	regulační, vedoucí k produkci B-lymfocytů
TNF	skupina cytokinů navozujících apoptózu
TNFR1	receptor pro TNF
TRADD	protein zapojený do navození apoptosy
U1-100	unikátní oblasti kódující HHV-6 geny
ÚLM	Ústav lékařské mikrobiologie 2. LFUK a FNM
US22	rodina genů shodných pro betaherpesviry

12 Seznam použité literatury

1. Aalto, S. M., E. Juvonen, aj. (2003). "Lymphoproliferative disease after allogeneic stem cell transplantation--pre-emptive diagnosis by quantification of Epstein-Barr virus DNA in serum." J Clin Virol **28**(3): 275-83.

2. Arbuckle, J. H., M. M. Medveczky, aj. (2010)"The latent human herpesvirus-6A genome specifically integrates in telomeres of human chromosomes in vivo and in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(12): 5563-8.

3. Ballestas, M. E., P. A. Chatis, aj. (1999). "Efficient persistence of extrachromosomal KSHV DNA mediated by latency-associated nuclear antigen." Science **284**(5414): 641-4.

4. Beillard, E., N. Pallisgaard, aj. (2003). "Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program." Leukemia **17**(12): 2474-86.

5. Belshe R. B. (1994) "Textbook of Human Virology." PSG Publishing Company,Inc. vol: 811-821).

6. Bjorklund, A., J. Aschan, aj. (2007). "Risk factors for fatal infectious complications developing late after allogeneic stem cell transplantation." Bone Marrow Transplant **40**(11): 1055-62.

7. Black, J. B., K. C. Sanderlin, aj. (1989). "Growth properties of human herpesvirus-6 strain Z29." J Virol Methods **26**(2): 133-45.

8. Bordon, V., S. Bravo, aj. (2008). "Surveillance of cytomegalovirus (CMV) DNAemia in pediatric allogeneic stem cell transplantation: incidence and outcome of CMV infection and disease." Transpl Infect Dis **10**(1): 19-23.

9. Boutolleau, D., C. Duros, aj. (2006). "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 **35**(3): 257-63.

10. Catusse, J., C. M. Parry, aj. (2007). "Inhibition of HIV-1 infection by viral chemokine U83A via high-affinity CCR5 interactions that block human chemokine-induced leukocyte chemotaxis and receptor internalization." Blood **109**(9): 3633-9.

11. Cebrian, J., C. Kaschka-Dierich, aj. (1982). "Inverted repeat nucleotide sequences in the genomes of Marek disease virus and the herpesvirus of the turkey." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(2): 555-8.

12. Clark, D. A., E. P. Nacheva, aj. (2006). "Transmission of integrated human herpesvirus 6 through stem cell transplantation: implications for laboratory diagnosis." J Infect Dis **193**(7): 912-6.

13. Clark, D. A., E. H. F. Tsao, aj. (2006). "Reply to Boutolleau et al. and Luppi etl al. " J Infect Dis **194**(7): 1021-1023

14. Colberg-Poley, A. M., L. D. Santomenna, aj. (1992). "Human cytomegalovirus US3 and UL36-38 immediate-early proteins regulate gene expression." J Virol **66**(1): 95-105.

15. Csoma, E., B. Meszaros, aj. "Dominance of variant A in human herpesvirus 6 viraemia after renal transplantation." Virol J **8**: 403.

16. Cuomo, L., A. Angeloni, aj. (1995). "Human herpesvirus 6 variant A, but not variant B, infects EBV-positive B lymphoid cells, activating the latent EBV genome through a BZLF-1-dependent mechanism." AIDS Res Hum Retroviruses **11**(10): 1241-5.

17. da Fonseca, M. A. and C. Hong (2008). "An overview of chronic oral graft-vs-host disease following pediatric hematopoietic stem cell transplantation." Pediatr Dent **30**(2): 98-104.

18. Dahl, H. H., D. R. Thorburn, aj. (2000). "Towards reliable prenatal diagnosis of mtDNA point mutations: studies of nt8993 mutations in oocytes, fetal tissues, children and adults." Hum Reprod **15 Suppl 2**: 246-55.

19. Daibata, M., T. Taguchi, aj. (1999). "Inheritance of chromosomally integrated human herpesvirus 6 DNA." Blood **94**(5): 1545-9.

20. De Bolle, L., L. Naesens, aj. (2005). "Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy." Clin Microbiol Rev **18**(1): 217-45.

21. Delecluse, H. J. and W. Hammerschmidt (1993). "Status of Marek's disease virus in established lymphoma cell lines: herpesvirus integration is common." J Virol **67**(1): 82-92.

22. Dewhurst, S., S. C. Dollard, aj. (1993). "Identification of a lytic-phase origin of DNA replication in human herpesvirus 6B strain Z29." J Virol **67**(12): 7680-3.

23. Dhepakson, P., Y. Mori, aj. (2002). "Human herpesvirus-6 rep/U94 gene product has single-stranded DNA-binding activity." J Gen Virol **83**(Pt 4): 847-54.

24. Di Luca, D., P. Mirandola, aj. (1996). "Distribution of HHV-6 variants in human tissues." Infect Agents Dis **5**(4): 203-14.

25. Enders, G., M. Biber, aj. (1990). "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 **18**(1): 12-5.

26. Fillet, A. M., I. Reux, aj. (1996). "Detection of human herpes virus 6 in AIDS-associated retinitis by means of in situ hybridization, polymerase chain reaction and immunohistochemistry." J Med Virol **49**(4): 289-95.

27. Flamand, L., A. L. Komaroff, aj. (2010) "Review, part 1: Human herpesvirus-6-basic biology, diagnostic testing, and antiviral efficacy." J Med Virol **82**(9): 1560-8.

28. Flamand, L., F. Romerio, aj. (1998). "CD4 promoter transactivation by human herpesvirus 6." J Virol **72**(11): 8797-805.

29. Fortunato, E. A. and D. H. Spector (1998). "p53 and RPA are sequestered in viral replication centers in the nuclei of cells infected with human cytomegalovirus." J Virol **72**(3): 2033-9.

30. Fragnet, L., M. A. Blasco, aj. (2003). "The RNA subunit of telomerase is encoded by Marek's disease virus." J Virol **77**(10): 5985-96.

31. Gautheret-Dejean, A., C. Manichanh, aj. (2002). "Development of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of human herpesvirus-6 infection and application to bone marrow transplant patients." J Virol Methods **100**(1-2): 27-35.

32. Gravel, A., C. B. Hall, aj. "Sequence analysis of transplacentally acquired human herpesvirus 6 DNA is consistent with transmission of a chromosomally integrated reactivated virus." J Infect Dis **207**(10): 1585-9.

33. Griffiths, P. D., M. Ait-Khaled, aj. (1999). "Human herpesviruses 6 and 7 as potential pathogens after liver transplant: prospective comparison with the effect of cytomegalovirus." J Med Virol **59**(4): 496-501.

34. Hall, C. B., M. T. Caserta, aj. (2008). "Chromosomal integration of human herpesvirus 6 is the major mode of congenital human herpesvirus 6 infection." Pediatrics **122**(3): 513-20.

35. Hall, C. B., M. T. Caserta, aj. (2010). "Transplacental congenital human herpesvirus 6 infection caused by maternal chromosomally integrated virus." J Infect Dis **201**(4): 505-7.

36. Hubacek, P., A. Hrdlickova, aj. (2012)"[Chromosomal integration of the sixth human herpes virus (HHV-6)]." Epidemiol Mikrobiol Imunol **61**(3): 58-66.

37. Hubacek, P., A. Hrdlickova, aj. (2013)"Prevalence of chromosomally integrated HHV-6 in patients with malignant desease and healthy donors in the Czech Republic." Folia Microbiologica **58**(1):87-90

38. Hubacek, P., K. Muzikova, aj. (2009). "Prevalence of HHV-6 integrated chromosomally among children treated for acute lymphoblastic or myeloid leukemia in the Czech Republic." J Med Virol **81**(2): 258-63.

39. Hubacek, P., A. Virgili, aj. (2009). "HHV-6 DNA throughout the tissues of two stem cell transplant patients with chromosomally integrated HHV-6 and fatal CMV pneumonitis." Br J Haematol **145**(3): 394-8.

40. Hudnall, S. D., T. Chen, aj. (2008). "Herpesvirus prevalence and viral load in healthy blood donors by quantitative real-time polymerase chain reaction." Transfusion **48**(6): 1180-7.

41. Chan, F. K., H. J. Chun, aj. (2000). "A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling." Science **288**(5475): 2351-4.

42. Chan, P. K., H. K. Ng, aj. (2001). "Prevalence and distribution of human herpesvirus 6 variants A and B in adult human brain." J Med Virol **64**(1): 42-6.

43. Chang, Y., E. Cesarman, aj. (1994). "Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma." Science **266**(5192): 1865-9.

44. Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156-9.

45. Isegawa, Y., T. Mukai, aj. (1999). "Comparison of the complete DNA sequences of human herpesvirus 6 variants A and B." J Virol **73**(10): 8053-63.

46. Isegawa, Y., Z. Ping, aj. (1998). "Human herpesvirus 6 open reading frame U12 encodes a functional beta-chemokine receptor." J Virol **72**(7): 6104-12.

47. Jarrett, R. F., D. A. Clark, aj. (1990). "Detection of human herpesvirus-6 DNA in peripheral blood and saliva." J Med Virol **32**(1): 73-6.

48. Jaworska, J., A. Gravel, aj. (2010) "Divergent susceptibilities of human herpesvirus 6 variants to type I interferons." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(18): 8369-74.

49. Kamble, R. T., D. A. Clark, aj. (2007). "Transmission of integrated human herpesvirus-6 in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation." Bone Marrow Transplant **40**(6): 563-6.

50. Kashanchi, F., J. Araujo, aj. (1997). "Human herpesvirus 6 (HHV-6) ORF-1 transactivating gene exhibits malignant transforming activity and its protein binds to p53." Oncogene **14**(3): 359-67.

51. Katano, H., K. Ogawa-Goto, aj. (2001). "Human-herpesvirus-8-encoded K8 protein colocalizes with the promyelocytic leukemia protein (PML) bodies and recruits p53 to the PML bodies." Virology **286**(2): 446-55.

52. Kieser, A. (2008). "Pursuing different 'TRADDes': TRADD signaling induced by TNF-receptor 1 and the Epstein-Barr virus oncoprotein LMP1." Biol Chem **389**(10): 1261-71.

53. Kishi, M., G. Bradley, aj. (1991). "Inverted repeat regions of Marek's disease virus DNA possess a structure similar to that of the a sequence of herpes simplex virus DNA and contain host cell telomere sequences." J Virol **65**(6): 2791-7.

54. Kofod-Olsen, E., K. Ross-Hansen, aj. (2012). "U20 is responsible for human herpesvirus 6B inhibition of tumor necrosis factor receptor-dependent signaling and apoptosis." J Virol **86**(21): 11483-92.

55. Kondo, K., T. Kondo, aj. (1991). "Latent human herpesvirus 6 infection of human monocytes/macrophages." J Gen Virol **72 (Pt 6)**: 1401-8.

56. Kondo, K., H. Nozaki, aj. (2003). "Detection of a gene cluster that is dispensable for human herpesvirus 6 replication and latency." J Virol **77**(19): 10719-24.

57. Kondo, K., K. Shimada, aj. (2002). "Identification of human herpesvirus 6 latency-associated transcripts." J Virol **76**(8): 4145-51.

58. Kositanont, U., C. Wasi, aj. (1999). "Primary infection of human herpesvirus 6 in children with vertical infection of human immunodeficiency virus type 1." J Infect Dis **180**(1): 50-5.

59. Kuppers, R., R. Schmitz, aj. (2005). "Pathogenesis of Hodgkin's lymphoma." Eur J Haematol Suppl(66): 26-33.

60. Lacroix, A., S. Collot-Teixeira, aj. (2010). "Involvement of human herpesvirus-6 variant B in classic Hodgkin's lymphoma via DR7 oncoprotein." Clin Cancer Res **16**(19): 4711-21.

61. Lee, S. O., R. A. Brown, aj. (2011). "Chromosomally integrated human herpesvirus-6 in kidney transplant recipients." Nephrol Dial Transplant **26**(7): 2391-3.

62. Leong, H. N., P. W. Tuke, aj. (2007). "The prevalence of chromosomally integrated human herpesvirus 6 genomes in the blood of UK blood donors." J Med Virol **79**(1): 45-51.

63. Levine, J. E., S. Paczesny, aj. (2008). "Etanercept plus methylprednisolone as initial therapy for acute graft-versus-host disease." Blood **111**(4): 2470-5.

64. Li, C., J. M. Goodrich, aj. (1997). "Interferon-gamma (IFN-gamma) regulates production of IL-10 and IL-12 in human herpesvirus-6 (HHV-6)-infected monocyte/macrophage lineage." Clin Exp Immunol **109**(3): 421-5.

65. Li, H., J. Zhang, aj. (2006). "Herpes simplex virus 1 infection induces the expression of proinflammatory cytokines, interferons and TLR7 in human corneal epithelial cells." Immunology **117**(2): 167-76.

66. Lindquester, G. J., N. Inoue, aj. (1996). "Restriction endonuclease mapping and molecular cloning of the human herpesvirus 6 variant B strain Z29 genome." Arch Virol **141**(2): 367-79.

67. Lu, C., Y. Zeng, aj. (2005). "Human herpesvirus 6 activates lytic cycle replication of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus." Am J Pathol **166**(1): 173-83.

68. Luppi, M., P. Barozzi, aj. (1998). "Expression of human herpesvirus-6 antigens in benign and malignant lymphoproliferative diseases." Am J Pathol **153**(3): 815-23.

69. Luppi, M., P. Barozzi, aj. (1994). "Integration of human herpesvirus-6 (HHV-6) genome in chromosome 17 in two lymphoma patients." Leukemia **8 Suppl 1**: S41-5.

70. Luppi, M., R. Marasca, aj. (1993). "Three cases of human herpesvirus-6 latent infection: integration of viral genome in peripheral blood mononuclear cell DNA." J Med Virol **40**(1): 44-52.

71. Lusso, P., B. Ensoli, aj. (1989). "Productive dual infection of human CD4+ T lymphocytes by HIV-1 and HHV-6." Nature **337**(6205): 370-3.

72. Marechal, V., A. Dehee, aj. (1999). "Mapping EBNA-1 domains involved in binding to metaphase chromosomes." J Virol **73**(5): 4385-92.

73. Mayne, M., C. Cheadle, aj. (2001). "Gene expression profile of herpesvirus-infected T cells obtained using immunomicroarrays: induction of proinflammatory mechanisms." J Virol **75**(23): 11641-50.

74. McGavin, J. K. and K. L. Goa (2001). "Ganciclovir: an update of its use in the prevention of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients." Drugs **61**(8): 1153-83.

75. Mori, T., K. Tanaka-Taya, aj. (2009). "Transmission of chromosomally integrated human herpesvirsus 6 (HHV-6) variant A from a parent to children leading to misdiagnosis of active HHV-6 infection." Transpl Infect Dis **11**(6): 503-6.

76. Morissette, G. and L. Flamand (2010) "Herpesviruses and chromosomal integration." J Virol **84**(23): 12100-9.

77. Morris, C., M. Luppi, aj. (1999). "Fine mapping of an apparently targeted latent human herpesvirus type 6 integration site in chromosome band 17p13.3." J Med Virol **58**(1): 69-75.

78. Nacheva, E. P., K. N. Ward, aj. (2008). "Human herpesvirus 6 integrates within telomeric regions as evidenced by five different chromosomal sites." J Med Virol **80**(11): 1952-8.

79. Ogawa-Goto, K., K. Tanaka, aj. (2003). "Microtubule network facilitates nuclear targeting of human cytomegalovirus capsid." J Virol **77**(15): 8541-7.

80. Ojima, T., K. Abe, aj. (2005). "IL-2-regulated persistent human herpesvirus-6B infection facilitates growth of adult T cell leukemia cells." J Med Dent Sci **52**(2): 135-41.

81. Oster, B. and P. Hollsberg (2002). "Viral gene expression patterns in human herpesvirus 6B-infected T cells." J Virol **76**(15): 7578-86.

82. Pellett, P. E., D. V. Ablashi, aj. (2012). "Chromosomally integrated human herpesvirus 6: questions and answers." Rev Med Virol **22**(3): 144-55.

83. Pongers-Willemse, M. J., O. J. Verhagen, aj. (1998). "Real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using junctional region specific TaqMan probes." Leukemia **12**(12): 2006-14.

84. Potenza, L., P. Barozzi, aj. (2009). "Prevalence of human herpesvirus-6 chromosomal integration (CIHHV-6) in Italian solid organ and allogeneic stem cell transplant patients." Am J Transplant **9**(7): 1690-7.

85. Riethman, H. (2008). "Human telomere structure and biology." Annu Rev Genomics Hum Genet **9**: 1-19.

86. Riley-Vargas, R. C., D. B. Gill, aj. (2004). "CD46: expanding beyond complement regulation." Trends Immunol **25**(9): 496-503.

87. Roizman B., P. E. Pellett (2001) "Fields - Virology", chapter 71

88. Rotola, A., T. Ravaioli, aj. (1998). "U94 of human herpesvirus 6 is expressed in latently infected peripheral blood mononuclear cells and blocks viral gene expression in transformed lymphocytes in culture." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(23): 13911-6.

89. Salahuddin, S. Z., D. V. Ablashi, aj. (1986). "Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders." Science **234**(4776): 596-601.

90. Santoro, F., P. E. Kennedy, aj. (1999). "CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6." Cell **99**(7): 817-27.

91. Schiewe, U., F. Neipel, aj. (1994). "Structure and transcription of an immediate-early region in the human herpesvirus 6 genome." J Virol **68**(5): 2978-85.

92. Singh, N. (2000). "Human herpesviruses-6, -7 and -8 in organ transplant recipients." Clin Microbiol Infect **6**(9): 453-9.

93. Snoeck, R. and E. De Clercq (2002). "Role of cidofovir in the treatment of DNA virus infections, other than CMV infections, in immunocompromised patients." Curr Opin Investig Drugs **3**(11): 1561-6.

94. Stoeckle, M. Y. (2000). "The spectrum of human herpesvirus 6 infection: from roseola infantum to adult disease." Annu Rev Med **51**: 423-30.

95. Tadagaki, K., K. Yamanishi, aj. (2007). "Reciprocal roles of cellular chemokine receptors and human herpesvirus 7-encoded chemokine receptors, U12 and U51." J Gen Virol **88**(Pt 5): 1423-8.

96. Takakuwa, T., W. J. Luo, aj. (2004). "Integration of Epstein-Barr virus into chromosome 6q15 of Burkitt lymphoma cell line (Raji) induces loss of BACH2 expression." Am J Pathol **164**(3): 967-74.

97. Takemoto, M., M. Koike, aj. (2005). "Human herpesvirus 6 open reading frame U14 protein and cellular p53 interact with each other and are contained in the virion." J Virol **79**(20): 13037-46.

98. Takemoto, M., T. Shimamoto, aj. (2001). "The R3 region, one of three major repetitive regions of human herpesvirus 6, is a strong enhancer of immediate-early gene U95." J Virol **75**(21): 10149-60.

99. Tanaka-Taya, K., J. Sashihara, aj. (2004). "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 **73**(3): 465-73.

100. Tanaka, Y., T. Suenaga, aj. (2013) "Herpesvirus 6 Glycoproteins B (gB), gH, gL and gQ are Necessary and Sufficient for Cell-to-Cell Fusion." J Virol.

101. Tang, H., S. Serada, aj. (2013)"CD134 is a cellular receptor specific for human herpesvirus-6B entry." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(22): 9096-9.

102. Teo, I. A., B. E. Griffin, aj. (1991). "Characterization of the DNA polymerase gene of human herpesvirus 6." J Virol **65**(9): 4670-80.

103. Thompson, J., S. Choudhury, aj. (1994). "A transforming fragment within the direct repeat region of human herpesvirus type 6 that transactivates HIV-1." Oncogene **9**(4): 1167-75.

104. Thomson, B. J., S. Dewhurst, aj. (1994). "Structure and heterogeneity of the a sequences of human herpesvirus 6 strain variants U1102 and Z29 and identification of human telomeric repeat sequences at the genomic termini." J Virol **68**(5): 3007-14.

105. Torelli, G., P. Barozzi, aj. (1995). "Targeted integration of human herpesvirus 6 in the p arm of chromosome 17 of human peripheral blood mononuclear cells in vivo." J Med Virol **46**(3): 178-88.

106. Torrisi, M. R., M. Gentile, aj. (1999). "Intracellular transport and maturation pathway of human herpesvirus 6." Virology **257**(2): 460-71.

107. Virtanen, J. O., M. Farkkila, aj. (2007). "Evidence for human herpesvirus 6 variant A antibodies in multiple sclerosis: diagnostic and therapeutic implications." J Neurovirol **13**(4): 347-52.

108. Wagstaff, A. J. and H. M. Bryson (1994). "Foscarnet. A reappraisal of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use in immunocompromised patients with viral infections." Drugs **48**(2): 199-226.

109. Wagstaff, A. J., D. Faulds, aj. (1994). "Aciclovir. A reappraisal of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy." Drugs **47**(1): 153-205.

110. Walker, S. L., R. S. Wonderling, aj. (1997). "Mutational analysis of the adeno-associated virus Rep68 protein: identification of critical residues necessary for site-specific endonuclease activity." J Virol **71**(4): 2722-30.

111. Walker, S. L., R. S. Wonderling, aj. (1997). "Mutational analysis of the adeno-associated virus type 2 Rep68 protein helicase motifs." J Virol **71**(9): 6996-7004.

112. Ward, K. N. (2005). "Human herpesviruses-6 and -7 infections." Curr Opin Infect Dis **18**(3): 247-52.

113. Ward, K. N., H. N. Leong, aj. (2006). "Human herpesvirus 6 chromosomal integration in immunocompetent patients results in high levels of viral DNA in blood, sera, and hair follicles." J Clin Microbiol **44**(4): 1571-4.

114. Ward, K. N., H. N. Leong, aj. (2007). "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 **45**(4): 1298-304.

115. Ward, K. N., A. D. Thiruchelvam, aj. (2005). "Unexpected occasional persistence of high levels of HHV-6 DNA in sera: detection of variants A and B." J Med Virol **76**(4): 563-70.

116. Watanabe, H., M. Daibata, aj. (2008). "Chromosomal integration of human herpesvirus 6 DNA in anticonvulsant hypersensitivity syndrome." Br J Dermatol **158**(3): 640-2.

117. WHO (2009) "Information for laboratory diagnostics of pandemic (H1N1) 2009 virus in humans."vol. no. s. 37

118. Wu, T. C., R. B. Mann, aj. (1990). "Detection of EBV gene expression in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease." Int J Cancer **46**(5): 801-4.

119. Yeo, W. M., Y. Isegawa, aj. (2008). "The U95 protein of human herpesvirus 6B interacts with human GRIM-19: silencing of U95 expression reduces viral load and abrogates loss of mitochondrial membrane potential." J Virol **82**(2): 1011-20.

120. Yoshikawa, T., Y. Asano, aj. (2002). "Human herpesvirus 6 viremia in bone marrow transplant recipients: clinical features and risk factors." J Infect Dis **185**(7): 847-53.

121. Yoshikawa, T., S. Suga, aj. (1991). "Human herpesvirus-6 infection in bone marrow transplantation." Blood **78**(5): 1381-4.

122. Zerr, D. M., J. R. Fann, aj. (2011). "HHV-6 reactivation and its effect on delirium and cognitive functioning in hematopoietic cell transplantation recipients." Blood **117**(19): 5243-9.

123. Zhou, Y., A. D. Attygalle, aj. (2007). "Angioimmunoblastic T-cell lymphoma: histological progression associates with EBV and HHV6B viral load." Br J Haematol **138**(1): 44-53.

124. Zou, P., Y. Isegawa, aj. (1999). "Human herpesvirus 6 open reading frame U83 encodes a functional chemokine." J Virol **73**(7): 5926-33.