

**Aus dem Institut für Virologie der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf**

**Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Jörg Timm**

**Serologischer und molekularer Nachweis von Infektionen  
mit den humanen Polyomaviren JC und BK bei Patienten  
mit einer Progressiven Multifokalen Leukenzephalopathie  
(PML)**

**Dissertation**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

vorgelegt von

Philipp Pierre Markwerth

2018

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Ortwin Adams

Zweitgutachter: PD Dr. med. Philipp Albrecht

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

*The CSF JCV antibody index for diagnosis of natalizumab-associated PML.*

Warnke C, von Geldern G, Markwerth P, Dehmel T, Hoepner R, Gold R, Pawlita M, Kümpfel T, Mäurer M, Stangel M, Wegner F, Hohlfeld R, Straeten V, Limmroth V, Weber T, Hermsen D, Kleinschnitz C, Hartung HP, Wattjes MP, Svenningsson A, Major E, Olsson T, Kieseier BC, Adams O.

*Annals of neurology* 2014, Dec. 76(6):792-801.

# Zusammenfassung

Bei der Progressiven Multifokalen Leukenzephalopathie (PML) handelt es sich um eine demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), welche durch das humane Polyomavirus JC (JCV) ausgelöst wird. Dabei kommt es zu einer Reaktivierung des in großen Teilen der Bevölkerung persistierenden Virus, fast immer hervorgerufen durch eine Immunschwäche des Wirts. In der Vergangenheit war dies vor allem während der AIDS-Epidemie, vor Entwicklung der hochaktiven-antiretroviralen-Therapie (HAART), ein Problem. Aktuell wird jedoch wieder eine Zunahme der Fallzahlen beobachtet, was auf die Verwendung neuartiger Antikörperpräparate wie z.B. Natalizumab zurückzuführen ist. Natalizumab ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper und wird in der Therapie der Multiplen Sklerose (MS) eingesetzt. Er verhindert die Migration von Leukozyten durch die Blut-Hirn-Schranke in das Gehirn. Da die Behandlungsmöglichkeiten einer PML sehr begrenzt sind und die Prognose der Erkrankung als schlecht einzustufen ist, ist die frühzeitige Diagnosestellung für den betroffenen Patienten von großer klinischer Bedeutung. Hierbei könnte sich neben dem direkten Nachweis des Virus mittels PCR der Liquor-Serum-Antikörper-Quotient ( $AI_{JCV}$ ) des gegen JCV gerichteten IgG als ein weiteres wichtiges Hilfsmittel erweisen. Zudem sucht man nach weiteren biologischen Markern, um betroffene von nicht betroffenen Patienten unterscheiden zu können.

In der vorliegenden Arbeit wurden Serum- und Liquorproben von PML-Patienten unter Natalizumabtherapie und von verschiedenen Kontrollgruppen mittels ELISA auf IgG- und IgM-Antikörper gegen JCV und ein weiteres humanes Polyomavirus, das BKV, untersucht. Ferner wurde die Affinität der gefundenen IgG gemessen und die Subklassen des gegen JCV gerichteten IgG bestimmt. Gleichzeitig wurde mittels *real time* PCR nach Virus-DNA in den Proben gesucht. Es sollte weiterhin geklärt werden, ob sich der  $AI_{JCV}$  für die Diagnostik einer PML eignet, ob es Unterschiede in der Antikörperreaktion auf das JC-Virus zwischen den einzelnen Gruppen gibt und ob es Hinweise auf eine Kreuzprotektion zwischen der JCV- und der BKV- Infektion gibt.

Es zeigte sich, dass die PML-Patientengruppen eine deutlich gesteigerte Anti-JCV-IgG Produktion im Vergleich mit den Kontrollgruppen hatten. Dabei konnten keine Unterschiede in der Affinität der Antikörper festgestellt werden. IgM-Antikörper scheinen bei der Immunantwort auf die Reaktivierung von JCV keine nennenswerte Rolle zu spielen, was darauf zurückzuführen sein könnte, dass der Erstkontakt mit dem Virus in der Regel lange vor dem Auftreten der PML erfolgte. Bei den Untersuchungen des  $AI_{JCV}$  wurde ein Verhältnis  $> 1,5$  als Zeichen einer intrathekalen Antikörperproduktion gewertet. Es zeigte sich, dass dies als spezifisches Zeichen einer PML zu werten ist und sich der  $AI_{JCV}$  daher als ergänzendes Hilfsmittel in der Diagnostik der PML eignet. Ferner gab es Hinweise, dass die Infektion mit JCV vor einer zusätzlichen Infektion mit BKV schützen kann.

# Abkürzungsverzeichnis

<b>5HT2A</b>	5-Hydroxytryptamin-Rezeptor 2A
<b>AI<sub>JCV</sub></b>	Liquor/Serum-Antikörperquotient-JCV
<b>AKT</b>	Proteinkinase B
<b>ANOVA</b>	Varianzanalyse
<b>ATP</b>	Adenosin 5'triphosphat
<b>AU</b>	arbitrary unit
<b>BKV</b>	BK-Virus
<b>BSA</b>	Bovines Serumalbumin
<b>CCD</b>	charge-coupled device
<b>D</b>	Messzeitpunkt 1
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>dsDNA</b>	Doppelstrang Desoxyribonukleinsäure
<b>DX1</b>	Messzeitpunkt 2
<b>DX2</b>	Messzeitpunkt 3
<b>E. coli</b>	Escherichia coli
<b>EDTA</b>	Ethylendiamin-tetraessigsäure
<b>EIA</b>	enzymatisches Immunadsorptions-verfahren
<b>ELISA</b>	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
<b>FAM</b>	6-Carboxy-Fluorescein
<b>HAART</b>	hochaktive antiretrovirale Therapie
<b>HPOS</b>	hochpositive Kontrolle
<b>IgG</b>	Immunglobulin G
<b>IgM</b>	Immunglobulin M
<b>IPTG</b>	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
<b>JCV</b>	JC-Virus
<b>kBp</b>	Kilobasenpaare
<b>KI</b>	Konfidenzintervall
<b>LB</b>	lysogeny broth
<b>LPOS</b>	niedrig positive Kontrolle
<b>MAPK</b>	Mitogenaktivierte Proteinkinase
<b>miRNA</b>	mikro RNA
<b>ml</b>	Milliliter
<b>MPOS</b>	mittlere Kontrolle
<b>mRNA</b>	messenger RNA
<b>MRT</b>	Magnetresonanztomographie
<b>MRZ</b>	Masern-Röteln-Zoster-Reaktion
<b>MS</b>	Multiple Sklerose
<b>MW</b>	Mittelwerte
<b>NAT</b>	Natalizumab

---

<b>NCCR</b>	noncoding control region
<b>NEM</b>	N-Ethylmaleimide
<b>NF-1/X</b>	nuclear factor-1 class X
<b>NLS</b>	nuclear localization signal
<b>nm</b>	Nanometer
<b>OD<sub>x</sub></b>	Optische Dichte bei x nm
<b>PBS</b>	phosphate buffered saline
<b>pMAL</b>	gelöstes Antigen
<b>PML</b>	progressive multifokale Leukenzephalopathie
<b>PP2A</b>	Proteinphosphatase 2A
<b>pRb</b>	retinoblastoma susceptibility gene
<b>qPCR</b>	quantitative Polymerasekettenreaktion
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>SAPK</b>	stressaktivierte Proteinkinase
<b>SEM</b>	Standardfehler
<b>S-Phase</b>	Synthesephase
<b>SMPB</b>	Succinimidyl 4-[p-aleimidophenyl]-butyrat
<b>SV-40</b>	Simianvirus 40
<b>TAMRA</b>	Tetramethyl-rhodamin
<b>T-Antigen</b>	Tumorantigen
<b>U</b>	Einheiten
<b>VP-1</b>	Virusprotein 1
<b>VP-2</b>	Virusprotein 2
<b>VP-3</b>	Virusprotein 3
<b>ZNS</b>	zentrales Nervensystem

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Polyomaviren . . . . .	1
1.1.1	Einteilung . . . . .	1
1.1.2	Morphologie . . . . .	2
1.2	JC-Virus . . . . .	4
1.2.1	Geschichte . . . . .	4
1.2.2	Morphologie und Virusproteine . . . . .	4
1.2.3	Genom . . . . .	6
1.2.4	Replikationszyklus . . . . .	6
1.2.5	Typen und Subtypen . . . . .	8
1.2.6	Pathogenese . . . . .	8
1.2.7	Epidemiologie . . . . .	10
1.2.8	Therapie . . . . .	10
1.3	Multiple Sklerose . . . . .	11
1.4	Natalizumab . . . . .	12
1.5	Fragestellung . . . . .	13
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>14</b>
2.1	Patientenmaterial . . . . .	14
2.2	Rekombinanter JCV-BKV-IgG-ELISA . . . . .	15
2.2.1	Prinzip . . . . .	15
2.2.2	Gewinnung von rekombinantem Protein VP-1 . . . . .	16
2.2.3	Anti-JCV-/Anti-BKV-IgG-ELISA . . . . .	18
2.2.4	Rekombinanter JCV-IgG-Subklassen-ELISA . . . . .	21
2.2.5	Affinitätsmessungen mittels rekombinantem JCV-IgG-ELISA . . . . .	22
2.3	MRZ-Reaktion/Reiber-Index . . . . .	24
2.4	Proteinbestimmung nach Bradford . . . . .	25
2.5	Quantitative Real Time PCR . . . . .	26
<b>3</b>	<b>Auswertung</b>	<b>28</b>
3.1	ELISA . . . . .	28
3.1.1	Anti-JCV-IgG . . . . .	28
3.1.2	Anti-BKV-IgG . . . . .	31
3.1.3	Liquor/Serum-Quotient . . . . .	33
3.1.4	Anti-JCV-IgG Subklassen . . . . .	35
3.1.5	Anti-JCV- und Anti-BKV-IgM . . . . .	36
3.1.6	Anti-JCV-IgG Affinität . . . . .	40
3.2	PCR-Ergebnisse . . . . .	41
3.2.1	Ergebnisse der Vergleichsgruppen . . . . .	41
3.2.2	JCV-DNA . . . . .	43
3.2.3	BKV-DNA . . . . .	44

<b>4 Diskussion</b>	<b>45</b>
4.1 JCV-IgG . . . . .	45
4.2 BKV-IgG . . . . .	47
4.3 Liquor/Serum-Quotient . . . . .	48
4.4 JCV-IgG-Subklassen . . . . .	49
4.5 JCV-IgM . . . . .	50
4.6 BKV-IgM . . . . .	51
4.7 Anti-JCV IgG Affinität . . . . .	52
4.8 PCR-JCV . . . . .	53
4.9 PCR-BKV . . . . .	54
<b>5 Schlussfolgerung</b>	<b>55</b>
<b>6 Literaturverzeichnis</b>	<b>56</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Polyomaviren

### 1.1.1 Einteilung

Die Polyomaviren sind eine Familie unbehüllter Doppelstrang - Desoxyribonukleinsäure - Viren (dsDNA-Viren), welche persistierende Infektionen bei verschiedenen Wirbeltieren auslösen.<sup>17</sup>

In den letzten Jahren wurde aufgrund der wachsenden Zahl neuentdeckter Polyomaviren versucht, eine sinnvolle Neuordnung in der Gattung zu schaffen. Zwischenzeitlich wurde die einzelne Gattung „Polyomavirus“ durch die drei neuen Gattungen „Avipolyomavirus“, „Orthopolyomavirus“ und „Wukipolyomavirus“ ersetzt.<sup>43</sup> Dabei umfassten die Gattungen Orthopolyomavirus und Wukipolyomavirus die Säugetier-Polyomaviren und die Gattung Avipolyomavirus die Vogel-Polyomaviren. Die Unterteilung der säugetierinfizierenden Gattungen ergab sich aus der Divergenz der Nukleotidsequenzen der beiden Gruppen.<sup>43</sup> Schwachpunkt dieser Einteilung war jedoch unter anderem, dass sie auf der Untersuchung unterschiedlicher Gene basierte.<sup>18</sup> Im Jahr 2015 wurde daher durch das *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) eine neue, standardisierte Nomenklatur eingeführt, die zwischen Alpha-, Beta-, Gamma- und Deltapolyomaviren unterscheidet.<sup>18</sup>

Gemäß dieser Einteilung zählt das JC-Virus (JCV), das BK-Virus (BKV) und Simianvirus 40 (SV-40) zusammen mit einigen anderen Virusarten zu den Betapolyomaviren (vgl. Abb. 1.1).

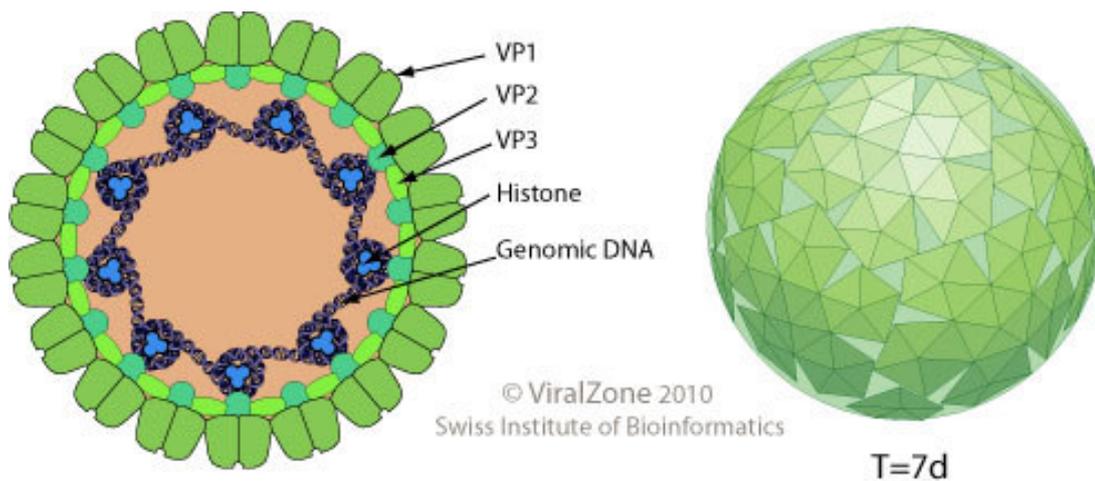
## 1.1.2 Morphologie

Die sphärischen Viruspartikel der Polyomaviren haben einen Durchmesser von 40 bis 45 nm, wobei das unbehüllte Kapsid aus 72 ikosaedrisch angeordneten Kapsomeren gebildet wird, welche an der Basis aus fünf Molekülen des Kapsidproteins Virusprotein 1 (VP-1) und je einem Molekül Virusprotein 2 (VP-2) oder Virusprotein 3 (VP-3) bestehen.<sup>31</sup> Diese Proteine sind nicht gleichförmig, sondern verdreht zueinander in einer  $T = 7$  Symmetrie angeordnet (vgl. Abb. 1.2).<sup>31</sup>

Insgesamt macht VP-1 etwa 70% des Virusproteins aus und wird an der Innenseite durch die Kapsidproteine VP-2 und VP-3 stabilisiert.<sup>31</sup> Die Virushülle ist extrem umweltstabil und widersteht Temperaturen bis 50°C über die Dauer von bis zu einer Stunde.<sup>31</sup>

Das Genom besteht aus einem kovalent geschlossenen doppelsträngigen Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Ring. Dieser liegt in einer mehrfach ineinander verdrillten *supercoiled* Form vor. Zusammen mit den Histonen H2A, H2B, H3 und H4 ähnelt der gebildete Nukleoproteinkomplex strukturell eukaryotischen Nukleosomen, allerdings kommt das Histon H1 nur im Genom der infizierten Zelle vor.<sup>31</sup>

Die Größe des Genoms liegt bei 4,7 bis 5,5 kBp, wobei die Leserahmen teilweise überlappen.<sup>31</sup> Es ist eine Einteilung in drei funktionelle Regionen möglich. Die frühen und späten Regionen kodieren Funktionen, die vor bzw. nach der DNA-Replikation benötigt werden.<sup>31</sup> Ein regulatorischer Abschnitt beinhaltet den Replikationsursprung sowie Promotorregionen für den frühen und späten Abschnitt.<sup>31</sup> Da kein bekanntes Polyomavirus über eine eigene DNA-Polymerase verfügt, ist die Anwesenheit von zelleigenen Polymerasen für die DNA-Replikation erforderlich.<sup>31</sup>



**Abb. 1.2:** Darstellung des nicht behüllten Kapsids mit einer ikosaedrischen  $T=7d$  Symmetrie. Durchmesser ca. 50 nm. ViralZone: [www.expasy.org/viralzone](http://www.expasy.org/viralzone), SIB Swiss Institute of Bioinformatics 



## 1.2 JC-Virus

### 1.2.1 Geschichte

Nachdem Åström, Mancall und Richardson 1958 einzelne Fälle einer Erkrankung beschrieben hatten, die sie als Progressive Multifokale Leukoencephalopathie (PML) bezeichneten, gab es immer wieder Hinweise, dass es sich hierbei um eine virale Erkrankung handeln könnte.<sup>10,19,76,86</sup> Der tatsächliche Nachweis von Viruspartikeln gelang erstmals 1965 in den Kernen von Gliazellen von PML-Patienten und bestätigte somit die vorausgegangen Vermutungen.<sup>95</sup>

Erstmals isoliert wurde das JC-Virus, auch Humanes Polyomavirus Typ II, schließlich 1971 durch Padget et al. aus dem Gehirn des an einer Progressiven Multifokalen Leukoencephalopathie erkrankten John Cunningham.<sup>63</sup> Aus den Initialen dieses Patienten setzt sich auch die Bezeichnung JC-Virus zusammen. Der Gruppe um Padget gelang die Anzucht eines Virus, das in späteren Untersuchungen eine ähnliche Größe und Gestalt zeigte wie die bereits bekannte SV-40 Subgruppe der Papovaviren.<sup>61</sup>

Die Bezeichnung Papovavirus, welche sich aus **P**apilloma-, **P**olyoma - und **S**imian **V**acuolating Virus 40 zusammensetzte, ist inzwischen nicht mehr gebräuchlich.<sup>31</sup> Stattdessen wurden Papillomavirus und Polyomavirus als eigene Familien eingeführt.<sup>31</sup>

In den vergangenen Jahren hat auch die Gruppe der Polyomaviren, wie zuvor beschrieben, einige Wandlungen ihrer Nomenklatur erfahren und unterliegt auch weiterhin einem Wandel.

### 1.2.2 Morphologie und Virusproteine

Das JC-Virus hat einen Durchmesser von etwa 45 nm. Sein Kapsid entspricht in seinem Aufbau dem Kapsid aller Polyomaviren und wird ebenfalls aus 72 Kapsomeren gebildet, welche, wie zuvor beschrieben, aus fünf VP-1 Molekülen und einem VP-2 oder VP-3 Molekül bestehen.<sup>31</sup> Das Kapsid beinhaltet die Virus-DNA.<sup>31</sup>

Die restlichen auf der DNA kodierten Proteine werden nur während der Replikation des Virus in der Wirtszelle gebildet und haben unterschiedliche Funktionen im Vermehrungszyklus.<sup>31</sup>

#### Großes Tumorantigen

Das große Tumorantigen (T-Antigen) ist ein Homohexamer, wobei jedes seiner Polypeptide aus 132 Aminosäuren besteht.<sup>56</sup>

Es hat großen Einfluss auf die Replikation des Virus, da es zum einen als Enzym auf verschiedene Signalwege der Wirtszelle einwirkt und diese in die Synthesephase (S-Phase) ihres Replikationszyklus bringt. Zum anderen fungiert es als Helikase und ermöglicht durch das Entwinden der DNA den Beginn der Replikation des Virus.<sup>31</sup>

Durch verschiedene Eingriffe in die Regulation des Replikationszyklus der Wirtszelle besitzt das große T-Antigen onkogenes Potential, was auch die Benennung als Tumorantigen erklärt.<sup>31</sup>

#### Kleines Tumorantigen

Das kleine T-Antigen wird aus 172 Aminosäuren gebildet und kann wie das große T-Antigen in verschiedene zelluläre Signalwege eingreifen und somit die Zellproliferation beeinflussen. Pallas et al. konnten zeigen, dass vor allem die Proteinphosphatase 2A (PP2A) durch das kleine T-Antigen beeinflusst wird.<sup>65</sup> Dies ist insofern von Bedeutung, als dass PP2A unter anderem den mitogenaktivierten-Proteinkinase-Signalweg (MAPK), den stressaktivierten-Proteinkinase-Signalweg (SAPK) und AKT (Proteinkinase B) reguliert, welche unter anderem Einfluss auf das Zellwachstum und die Regulierung der Apoptose haben.<sup>83,90</sup>

### Virusprotein 1

Das Virusprotein 1 (VP-1) macht mit etwa 70% den größten Teil der Virushülle des JC-Virus aus.<sup>31</sup> Es handelt sich um ein Homopentamer, dessen Ketten aus jeweils 272 Aminosäuren gebildet werden und das sich zu einem ikosaedrischen Kapsid zusammenlagert.<sup>58</sup>

Da VP-1 den äußeren Teil der Hülle bildet ist es für die Bindung des Virus an seine Zielzelle verantwortlich.<sup>31</sup> Weitere Funktionen beim Transport des Virus in der Zelle werden zurzeit noch untersucht.<sup>31</sup>

### Virusprotein 2

Virusprotein 2 (VP-2) gehört zum inneren Teil der Virushülle.<sup>31</sup> Es besitzt an seinem N-Terminus eine Tetradekansäure und am C-Terminus funktionelle Regionen zur Bindung an DNA, zur Interaktion mit VP-1 und ein *nuclear localization signal* (NLS).<sup>33</sup> Bei dem NLS handelt es sich um eine kurze Aminosäuresequenz, welche an sog. Importine bindet, folglich wird VP-2 für den Transport von VP-1 in den Nukleus benötigt und scheint auch für die Replikation der Virus-DNA vonnöten zu sein.<sup>31,33</sup>

### Virusprotein 3

Virusprotein 3 (VP-3) wird aus der gleichen Gensequenz translatiert wie VP-2 und ist daher zu zwei Dritteln mit diesem identisch.<sup>31,33</sup> Es besitzt ebenfalls am C-Terminus funktionelle Regionen zur Bindung an DNA sowie zur Interaktion mit VP-1 und NLS. Wie VP-2 wird es für den Transport von VP-1 in den Nukleus benötigt.<sup>31,33</sup>

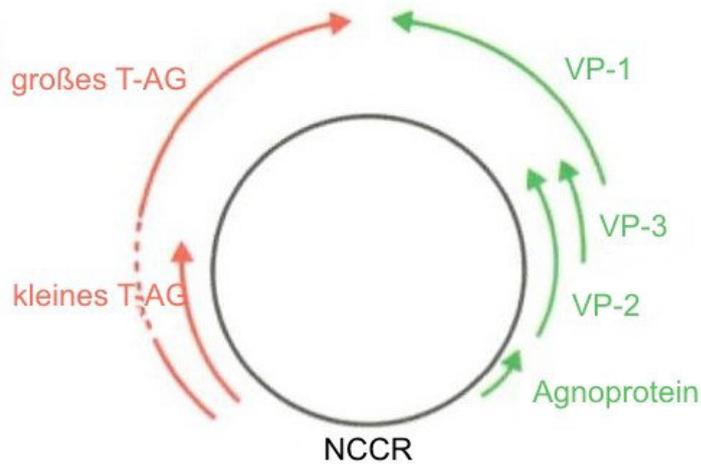
### Agnoprotein

Das Agnoprotein ist ein aus 32 Aminosäuren bestehendes Polypeptid, welches Dimere oder Oligomerkomplexe bildet.<sup>78</sup> Es wird nach dem Eindringen des Virus in die Zielzelle gebildet und findet sich dort vorrangig in der Nähe des Nukleus.<sup>79</sup> Es interagiert mit verschiedenen Proteinen der Wirtszelle, wie z.B. FEZ1 (*Fasciculation and elongation protein zeta-1*) und HP1 alpha (*Heterochromatin Protein 1*) und nimmt Einfluss auf den Transport von Viruspartikeln vom Nukleus ins Zytoplasma.<sup>60</sup> Außerdem greift es in die DNA-Reparaturfunktionen der Wirtszelle ein, indem es die Aktivität der Reparaturproteine Ku70 und Ku80 herabsetzt.<sup>26</sup> Damit ist es für die Transkription und Replikation des JC-Virus von großer Bedeutung.<sup>79</sup>

### 1.2.3 Genom

Wie alle Polyomaviren besitzt auch das JC-Virus einen doppelsträngigen, kovalent geschlossenen DNA-Ring, der wie bereits erwähnt in *supercoiled* Form vorliegt und aus 5130 Basenpaaren besteht.<sup>31</sup> Auch hier kann eine Einteilung in drei funktionelle Regionen vorgenommen werden, wobei der Replikationsursprung von einem frühen Abschnitt für das große und kleine T-Antigen und einem späten Abschnitt für die Hüllproteine VP-1, VP-2 und VP-3 sowie das Agnoprotein unterschieden werden kann (vgl. Abb. 1.3).<sup>31</sup>

Durch Unterschiede in nichtkodierenden Regionen des Genoms kommt es zu einer Vielzahl unterschiedlicher Virus-Typen und Subtypen.



**Abb. 1.3: Genstruktur des JC-Virus.** Ausgehend vom Ursprung, welcher auch als *noncoding control region* (NCCR) bezeichnet wird, werden die mRNA für die Antigene der frühen Phase (rot) und der späten Phase (grün) der Replikation abgelesen. Abb. modifiziert nach *National Macedonian Academy of Arts and Sciences* (CC-BY-SA-4.0).

### 1.2.4 Replikationszyklus

Der erste Schritt im Replikationszyklus des JC-Virus ist die Bindung an die Zelloberfläche einer Gliazelle, welche das Hauptziel des Virus darstellt.<sup>31</sup> Hierbei dienen eine endständige  $\alpha(2,6)$  gebundene N-Acetylneuraminsäure und der 5HT<sub>2A</sub> Serotoninrezeptor als Bindungsstelle und Ausgangspunkt der clathrinvermittelten Endozytose.<sup>9</sup> Wie diese Rezeptoren und das Virus physikalisch miteinander in Beziehung treten, ist bisher nicht geklärt; für den Eintritt in die Zelle sind sie jedoch notwendig. Zellen, die den Rezeptor nicht exprimieren oder deren Rezeptoren mittels Antikörper oder Rezeptorantagonisten blockiert sind, können nicht durch das JC-Virus infiziert werden.<sup>31</sup> Vermutlich erfolgt die Bindung des Virus an die Zelle mittels des VP-1, welches zum einen den größten Teil der Virushülle ausmacht und zum anderen den nach außen gerichteten Teil der Hülle darstellt.<sup>31</sup> Außerdem besitzt VP-1 eine Bindungsstelle für Zuckerreste.<sup>84</sup>

Nach der Bindung an den Rezeptor erfolgt die Phosphorylierung eines bisher unbekanntes Proteins und das Virus wird mittels clathrinabhängiger Endozytose in die Zelle geschleust.<sup>66</sup> Für den weiteren Transport zum Nukleus sind Mikrotubuli und Mikrofilamente nötig.<sup>8</sup> Qu et al. konnten zeigen, dass die JC-Viruspartikel bis zum Erreichen der Kernporen intakt bleiben und VP1 für den Eintritt in den Nukleus benötigt wird.<sup>72</sup>

Nach der Freisetzung der Virus-DNA im Nukleus der Wirtszelle erfolgt die Transkription durch die zelluläre Ribonukleinsäure-Polymerase II (RNA-Polymerase).<sup>31</sup> Die Transkription scheint hierbei von einer

Vielzahl zellspezifischer Transkriptionsfaktoren abhängig zu sein. Besondere Bedeutung hat hierbei *nuclear factor-1 class X* (NF-1/X).<sup>31</sup> Dieser Faktor ist besonders in Gliazellen und anderen Zielzellen des JC-Virus ausgeprägt vorhanden und scheint somit für die Zellspezifität mit ausschlaggebend zu sein.<sup>31</sup> Durch *splicing* werden unterschiedliche mRNA gebildet, von denen im Anschluss die Virusproteine translatiert werden.<sup>31</sup> Hierbei kommt den in der Frühphase der Replikation gebildeten Antigenen eine besondere Rolle zu. Um die Replikation des Virus zu ermöglichen, muss die Wirtszelle in die S-Phase ihres Replikationszyklus gebracht werden. Dies geschieht durch die Interaktion des großen T-Antigens mit dem *retinoblastoma susceptibility gene* (pRb) und den Tumorsuppressorgenen p107 und p130.<sup>27-29,31,37</sup> Außerdem wird durch Interaktion dieses und anderer Virusantigene mit Enzymen der Wirtszelle und eigene Enzymaktivität die Replikationsausbeute maximiert.<sup>81,92</sup> Sullivan et al. konnten zeigen, dass die Genexpression durch virus-eigene Mikro-RNA (miRNA) reguliert wird und so die Produktion von Antigenen, welche durch die Immunabwehr des Wirtes erkannt werden könnten, gesteuert wird.<sup>85</sup>

Nachdem in der Frühphase der Replikation verschiedene Virusantigene gebildet wurden, beginnt auch die Replikation der Virus-DNA. Auch hier spielt das große T-Antigen eine entscheidende Rolle. Es ist mit einer Helikasefunktion an der Initiation des Replikationszyklus beteiligt und für die Elongation der neu gebildeten DNA-Stränge nötig.<sup>31,52,81</sup> Die Replikation der Virus-DNA erfolgt parallel in beide Richtungen, sodass am Ende zwei an einem Punkt zusammenhängende zirkuläre Moleküle gebildet werden, welche die Topoisomerase II voneinander trennt.<sup>31</sup>

Parallel zur DNA-Replikation werden außerdem die Virusantigene der späten Transkription gebildet.<sup>31</sup> Es handelt sich hierbei um die drei Hüllproteine VP-1, VP-2 und VP-3, sowie das Agnoprotein.<sup>31</sup> Die Hüllproteine werden in den Nukleus transloziert und fügen sich dort zum Virion zusammen, welches mit der replizierten DNA beladen wird.<sup>31</sup> Der genaue Ablauf bleibt bisher unklar, da auch leere Virushüllen gefunden werden können, wobei nicht gesagt werden kann, ob es sich um fehlerhafte Endprodukte oder Vorstufen des späteren Endprodukts handelt.<sup>31</sup>

Ebenfalls unklar ist bisher der genaue Mechanismus der Freisetzung der fertigen Viruspartikel. Es gibt sowohl Hinweise auf eine Zerstörung der Wirtszelle durch Apoptose, als auch darauf, dass zumindest SV40 Zellen ohne deren Lyse verlassen kann.<sup>21,54,59</sup> JCV scheint jedoch, über sein großes T-Antigen, primär einen lytischen bzw. nekrotischen Effekt auf seine Wirtszelle zu haben.<sup>80</sup>

Das Einwirken der Virusantigene auf verschiedene Tumorsuppressorgene und die Aktivierung unterschiedlichster Signalkaskaden innerhalb der Wirtszelle, welches für die Replikation des Virus notwendig ist, bedingt gleichzeitig das onkogene Potential, das das JC-Virus besitzt.<sup>31</sup> Im normalen Replikationszyklus hat dies keine Konsequenz, da die Wirtszelle im Anschluss an die Virusreplikation zerstört wird. Kommt es jedoch nicht zu einer Vermehrung und Freisetzung des Virus, kann es durch die nun fehlerhafte Funktion der oben genannten Faktoren, zu einer unkontrollierten Vermehrung der Wirtszelle kommen.<sup>31</sup> So konnte im Tierversuch, nach Infektion mit JCV, die Entwicklung von Medulloblastomen, Glioblastomen oder Pineozytomen beobachtet werden.<sup>64</sup> In welchem Umfang JC-Virus beim Menschen an der Entstehung von Tumoren beteiligt ist, wird derzeit noch untersucht. Hinweise auf eine Beteiligung ergaben sich jedoch bereits durch Nachweis von JCV-DNA in Oligoastrozytomen und Xantroastrozytomen.<sup>15,75</sup> Ferner steht das Virus im Verdacht an der Entstehung von Leukämien und Lymphomen, sowie von Kolonkarzinomen beteiligt zu sein.<sup>49,82</sup>

### 1.2.5 Typen und Subtypen

In den letzten Jahren wurden etliche molekulargenetische Untersuchungen an Proben verschiedenster menschlicher Populationen durchgeführt. Es zeigte sich, dass es verschiedene JC-Virus Varianten auf der Welt gibt, welche eine starke regionale Variabilität aufweisen. Derzeit erfolgt eine Einteilung in acht Hauptstämme des JC-Virus, wobei dieses Feld Gegenstand weiterer Forschung ist und mit der Entdeckung weiterer Stämme gerechnet werden kann.<sup>3,6,11,36,40,93</sup> Die Stämme unterscheiden sich in der das VP-1 kodierenden Nukleotidsequenz und sind offensichtlich das Ergebnis der Virusevolution in den unterschiedlichen Wirtspopulationen.<sup>5</sup>

Grob kann gesagt werden, dass in Europa üblicherweise die JC-Virus Typen 1 und 4 vorkommen, während Typ 2 in Asien und bei Ureinwohnern des amerikanischen Kontinents anzusiedeln ist.<sup>4,7</sup> Die Typen 3 und 6 kommen wiederum vor allem in Afrika vor.<sup>1</sup> Im südlichen Asien, sowie auf einigen Pazifikinseln finden sich vorwiegend die Typen 7 und 8.<sup>7</sup>

Die ausgeprägten regionalen Unterschiede können unabhängig von der virologischen Forschung auch für anthropologische Untersuchungen herangezogen werden und Hinweise auf die Ausbreitung von ethnischen Gruppen in bestimmten Regionen geben.<sup>20</sup>

Ferner könnten die verschiedenen Varianten ein unterschiedliches pathogenes Potential besitzen. So konnten Agostini et al. 1997 zeigen, dass sich bei Patienten, die durch eine Reaktivierung des JC-Virus eine PML entwickelt hatten, überdurchschnittlich häufig JC-Virus Typ 2 im Gehirn fand.<sup>2</sup>

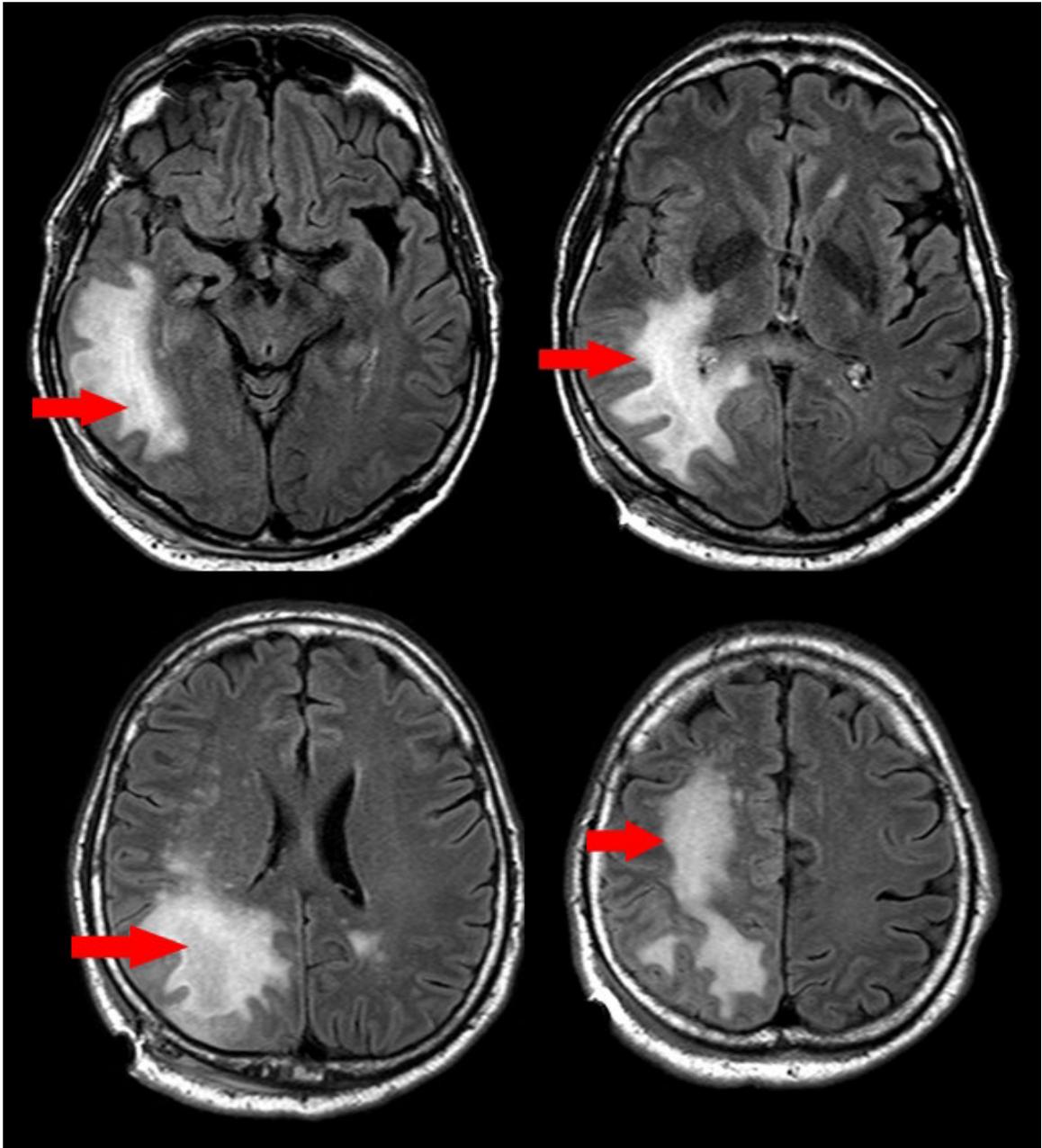
Diese Virustypen können weiter in unzählige Subtypen und diese wiederum in unterschiedliche Virusstränge unterteilt werden, wobei sich diese hauptsächlich durch einzelne unterschiedliche Nukleotide voneinander unterscheiden.<sup>5</sup> So divergieren einzelne Stränge von bspw. JCV Typ 2 Subtyp A (JCV Typ 2A) in einem Größenordnungsbereich von 0,02% bis etwa 0,5% unterschiedlicher Nukleotide voneinander, während die Unterschiede zwischen den einzelnen Subtypen, wie z.B. Typ 2A und 2B, etwas größer sind und im Bereich um 1% unterschiedlicher Nukleotide liegen.<sup>5</sup> Diese Unterschiede können durch Insertion oder Deletion von Basen im Replikationszyklus bedingt sein.<sup>5</sup>

### 1.2.6 Pathogenese

Wahrscheinlich erfolgt die Erstinfektion mit dem JC-Virus bereits im Kindesalter über den Respirationstrakt oder fäkal-oral durch Schmierinfektion.<sup>31</sup> Dabei bleibt die Erstinfektion fast immer symptomlos, führt jedoch zu einer lebenslangen Persistenz des Erregers in Epithelzellen der Niere und möglicherweise auch im Knochenmark.<sup>31</sup> Während dies für den gesunden, immunkompetenten Wirt kein Problem darstellt, besteht unter Immunsuppression die Gefahr einer JCV-Reaktivierung in Form einer Manifestation im zentralen Nervensystem (ZNS) unter dem Bild einer Progressiven Multifokalen Leukenzephalopathie.<sup>31</sup>

Die Progressive Multifokale Leukenzephalopathie ist eine demyelinisierende Erkrankung des Gehirns, welche durch das JC-Virus ausgelöst wird. In der Magnetresonanztomographie (MRT) zeigen sich bei der Erkrankung hyperintense Läsionen des Marklagers (vgl. Abb. 1.4).<sup>31</sup> Betroffen sind immunsupprimierte Personen, zum Beispiel nach Organtransplantationen, mit malignen Grunderkrankungen oder granulomatösen Erkrankungen.<sup>31</sup> Insbesondere zu Beginn der *Acquired Immune Deficiency Syndrome* (AIDS)-Epidemie, in welcher noch keine effektive Therapie verfügbar war, stellten HIV-Patienten den größten Anteil betroffener Personen dar. Etwa 5 bis 10% aller AIDS-Kranken waren von einer PML betroffen, damit machte diese Gruppe ca. 80% aller PML-Fälle aus.<sup>31</sup> Die PML zählt gemäß *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) zu den AIDS-definierenden Erkrankungen. Mit dem Aufkommen der hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) 1996 nahm die Zahl der HIV-positiven PML-Patienten zwar wieder deutlich ab, aber trotz dieser Fortschritte ist die Zahl der PML-Patienten seit den 1980er Jahren auf der ganzen Welt angestiegen.<sup>31</sup> Grund hierfür dürfte die steigende Zahl therapiebedingt immunsupprimierter Patienten sein. Insbesondere die Zunahme an Behandlungen mit immunsuppressiven Medikamenten wie Rituximab, Infliximab oder Natalizumab, kommt hierfür als Ursache in Frage. Insbesondere bei der Behandlung der

Multiplen Sklerose (MS) mit dem humanisierten anti-alpha-4-Integrin Antikörper Natalizumab (Tysabri®) kann ebenfalls als schwerwiegende Nebenwirkung eine PML auftreten.<sup>12,22,50</sup>



**Abb. 1.4: MRT-Aufnahmen eines Patienten mit PML.** Es zeigen sich hyperintense Marklagerherde rechtshemisphärisch temporo-occipital (rote Pfeile). Die Abbildung wurde freundlicherweise durch Priv.-Doz. Dr. med. Michael Mull, Klinik für Diagnostische und Interventionelle Neuroradiologie, Universitätsklinikum Aachen, zur Verfügung gestellt.

### 1.2.7 Epidemiologie

Die Seroprävalenz des JC-Virus ist zurzeit noch Gegenstand der Forschung und kann daher noch nicht abschließend beurteilt werden. In neueren Studien zeigte sich jedoch, dass die Wahrscheinlichkeit mit dem Virus infiziert zu sein mit dem Alter zunimmt und in der Gruppe der 50 bis 60 Jährigen bei etwa 70% liegt.<sup>87</sup> In der Altersgruppe der unter 20 Jährigen liegt sie noch bei etwa 37%.<sup>87</sup> Bei den Untersuchungen zeigten sich keine Unterschiede in der Geschlechterverteilung.<sup>87</sup> So fanden Warnke et al. in einer Kohorte von 511 MS-Patienten im Blut von 55% der untersuchten Frauen anti-JCV-Antikörper.<sup>87</sup> Bei den untersuchten Männern konnten die Antikörper in 58% der Fälle gefunden werden.<sup>87</sup>

In dieser Studie waren insgesamt 56% aller untersuchten Personen seropositiv für anti-JCV-Antikörper.<sup>87</sup>

Die Durchseuchung in der Gesamtbevölkerung dürfte sich in einem ähnlich hohen Prozentsatz bewegen. Bisher ist der serologische Nachweis einer JC-Virus-Infektion jedoch nur an wenigen Instituten verfügbar, sodass flächendeckende Untersuchungen nicht möglich waren.

### 1.2.8 Therapie

Aufgrund der hohen Durchseuchungsrate in der Bevölkerung können zur Verhinderung von Infektionen mit dem JC-Virus keine expositionsprophylaktischen Maßnahmen empfohlen werden. Auch eine Impfung gegen das Virus ist aktuell nicht möglich, wobei es hier Forschungsaktivitäten gibt, die sich jedoch noch in einem frühen Stadium der Entwicklung befinden.<sup>42,74</sup>

Eine kausale Therapie der PML ist derzeit ebenfalls nicht verfügbar. Es gibt zwar Fallberichte, in denen ein positiver Effekt einer Behandlung mit Mefloquin beschrieben wurde, allerdings konnten in größeren Untersuchungen mit randomisierten Patientengruppen diese Ergebnisse nicht reproduziert werden.<sup>23,35</sup> Therapie der Wahl ist daher weiterhin das Aussetzen der immunsuppressiven Therapie und die Unterstützung der körpereigenen Immunabwehr.

Bei Patienten, die unter Natalizumab eine PML entwickelt haben, kann zusätzlich zum Abbruch der Therapie, der verabreichte Antikörper durch Plasmapherese aus dem Blut entfernt werden.

Bei HIV-positiven Patienten stellt die HAART und damit die Aufrechterhaltung der T-Zellimmunität den bisher wirkungsvollsten Schutz vor der Entwicklung einer PML dar.

Bei diesen beiden Patientenkollektiven kann die PML durch eine rasche Diagnosesicherung und die oben genannten Maßnahmen reversibel sein oder zumindest in ihrem Ausmaß begrenzt werden.

## 1.3 Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems, bei der es zu einem Verlust der Myelinscheiden kommt, wobei neuere Studien zusätzlich auch früh auftretende axonale Schäden nahelegen.<sup>48</sup> Hierbei entstehen verteilt über das ganze ZNS multiple, entzündliche Entmarkungsherde, wodurch die Erkrankung in ihrem Auftreten äußerst variabel ist und, je nach Lage der Entmarkungsherde im Gehirn und Rückenmark, fast jedes neurologische Symptom verursachen kann.<sup>25</sup> So ist zum Beispiel die Retrobulbärneuritis ein typisches, wenn auch nicht spezifisches Symptom.<sup>25</sup>

Die Erkrankung kann in Abhängigkeit ihres Verlaufs in eine schubförmig-remittierende, eine primär-progrediente und eine sekundär-progrediente Form eingeteilt werden, wobei die ersten Symptome häufig zwischen dem 15. und 40. Lebensjahr auftreten. Die Prävalenz liegt in Deutschland bei geschätzt 149 Erkrankten pro 100.000 Einwohner, wobei Frauen etwa doppelt so häufig betroffen sind wie Männer.<sup>38</sup> Die Ursachen der Erkrankung sind bisher nicht eindeutig geklärt. Auffällig ist jedoch, dass die regionale Erkrankungshäufigkeit mit der Entfernung vom Äquator ansteigt, sodass über die Beteiligung eines Umweltfaktors spekuliert werden kann.<sup>32</sup>

Als diagnostischer Standard haben sich die 2001 erstmalig veröffentlichten McDonald Kriterien etabliert, welche 2005 und 2011 revidiert worden sind.<sup>55,69,70</sup> Zu ihnen gehören neben der klinischen Präsentation, der Nachweis MS-typischer Veränderungen in der Bildgebung und die Liquordiagnostik. Letztere basiert auf der intrathekalen, polyspezifischen und oligoklonalen Immunreaktion bedingt durch die MS.<sup>55,69,70</sup> Zu deren Nachweis sind unterschiedliche Methoden etabliert, welche sich in ihrer Sensitivität und Spezifität gegenseitig ergänzen.<sup>34,41</sup> So kann zum einen der Gesamt-IgG Serum/Liquor-Quotient (LSQges) bestimmt werden, wobei dieses Verfahren einfach durchführbar, jedoch von geringer Aussagekraft ist.<sup>34</sup> Ein relativ sensitives Testverfahren stellt der isoelektrische Nachweis oligoklonaler Banden dar.<sup>34</sup> Bei vermehrtem Auftreten von Banden im Liquor, im Vergleich zum Serum, spricht dies für eine Immunglobulinsynthese im zentralen Nervensystem. Das Auftreten selbiger bei anderen Erkrankungen des ZNS führt jedoch zu einer geringen Spezifität der Untersuchung. Als dritte Möglichkeit der Liquordiagnostik ist die Masern-Röteln-Zoster-Reaktion (MRZ) etabliert.<sup>41</sup> Diese basiert auf der polyspezifischen Mitreaktion des Immunsystems, wodurch es zu einer Bildung von Antikörpern kommt, ohne dass deren spezifisches Antigen nachweisbar ist. Die Reaktion ist weniger sensitiv als der Nachweis oligoklonaler Banden, aber spezifischer.<sup>41</sup> Grundlage der Berechnungen ist der Reiberquotient – also der Liquor-Serum-Quotient der IgG gegen Röteln, Masern und Varizellen im Verhältnis zur Albuminkonzentration – und die insgesamt gemessene IgG-Konzentration.

Bei der Behandlung der MS unterscheidet man im Wesentlichen eine Schubtherapie von einer immunmodulatorischen Therapie.<sup>71</sup> Ziel der Schubtherapie ist eine schnelle Rückbildung von in einem MS-Schub aufgetretenen Symptomen durch Gabe hochdosierter Glucokortikoide oder durch Plasmapherese.<sup>71</sup> Durch eine immunmodulatorische Therapie wird versucht, mögliche axonale Schäden zu begrenzen.<sup>71</sup> In den aktuellen Leitlinien wird daher ein möglichst früher Beginn einer solchen Basistherapie empfohlen.<sup>71</sup>

Eingesetzt werden hierbei, entsprechend der Leitlinien, in erster Linie Glatirameracetat und Beta-Interferone. Reicht diese Basistherapie nicht aus, um ein Fortschreiten der Erkrankung zu verhindern, wird als Eskalationstherapie mit Medikamenten wie Mitoxantron, Natalizumab oder Fingolimod begonnen.<sup>71</sup>

Die Prognose der Erkrankung ist schwer vorherzusagen, neuere Studien lassen aber in der Mehrzahl der Fälle einen positiveren Verlauf vermuten, als in der Vergangenheit angenommen wurde.<sup>67</sup> Grundsätzlich ist die Erkrankung jedoch weiterhin nicht heilbar.

## 1.4 Natalizumab

Natalizumab (NAT) ist ein humanisierter monoklonaler IgG<sub>4</sub> Antikörper welcher aus einer Myelom-Zelllinie von Mäusen gewonnen wird.<sup>51</sup> Es verhindert durch Inhibition von  $\alpha$ 4-Integrinen die Bindung von Leukozyten an die Gefäßwand und verhindert somit deren Migration in das ZNS. In verschiedenen Studien konnte durch NAT-Behandlung eine deutliche Schubratenreduktion um bis zu 67% und eine verminderte Behinderungsrate nachgewiesen werden.<sup>68,77</sup>

Entwickelt wurde das Medikament in den 1990er Jahren von der Firma Biogen und wird aktuell unter dem Namen Tysabri<sup>®</sup> in den Handel gebracht. Nur drei Monate nach der Zulassung in den USA wurde NAT im Februar 2005 wieder vom Markt genommen, da es bei drei behandelten MS-Patienten zu einer PML gekommen war. Zwei der drei Betroffenen starben an den Folgen der Erkrankung.<sup>94</sup> Trotzdem erfolgte im März 2006 die Wiedenzulassung des Medikaments durch die US-amerikanische Arzneimittelbehörde FDA (*Food and Drug Administration*), sowie die Erstzulassung in der EU (Europäische Union).

Bei der Behandlung mit NAT ist jedoch weiterhin die Gefahr der Entwicklung einer PML zu beachten.<sup>94</sup> So ging das Paul-Ehrlich-Institut 2010 von einem Risiko von 1:263 innerhalb von drei Jahren nach Therapiebeginn aus.<sup>91</sup>

Ob es zur Entwicklung einer PML kommt, scheint im Wesentlichen von drei Risikofaktoren beeinflusst zu werden. Dabei handelt es sich zum einen um das Bestehen einer latenten JC-Virus Infektion, welche sich diagnostisch im Nachweis von anti-JCV-Antikörpern zeigt. Zum anderen wird das Risiko sowohl durch eine Behandlungsdauer von mehr als zwei Jahren, als auch von einer immunsuppressiven Vorbehandlung beeinflusst. Zur Minimierung des PML-Risikos wird daher in den aktuellen Leitlinien vor Beginn der NAT-Behandlung ein Test auf anti-JCV-Antikörper empfohlen, welcher bei negativem Ergebnis wegen der Gefahr der Neuinfektion alle sechs Monate zu wiederholen ist.<sup>71</sup> Patienten die länger als zwei Jahre mit NAT behandelt werden, sind besonders über das erhöhte Risiko einer PML aufzuklären.

Kommt es im Laufe der Behandlung zu Symptomen, welche verdächtig auf eine PML sind, ist die Behandlung mit NAT auszusetzen, bis eine Abklärung erfolgt ist und eine PML ausgeschlossen werden kann.<sup>71</sup>

## 1.5 Fragestellung

In der Therapie der rezidivierenden Multiplen Sklerose ist Natalizumab (NAT) seit einigen Jahren etabliert. Allerdings kommt es immer wieder bei einzelnen Patienten, die mit NAT behandelt wurden, zu einer schwerwiegenden Komplikation, der progressiven multifokalen Leukenzephalopathie (PML). Bei der PML handelt es sich um eine demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), welche durch eine Infektion mit dem JC-Virus (JCV) ausgelöst wird.

Die frühzeitige Diagnose dieser Komplikation gestaltet sich häufig äußerst schwierig, da das klinische Bild und die radiologischen Zeichen oft unspezifisch und variabel sind. Es kann auch nicht immer zwischen den Symptomen der PML und der MS klar unterschieden werden. Bisher fehlen nichtinvasive Verfahren zur Bestätigung einer PML nach dem Entdecken verdächtiger Läsionen in der Magnetresonanztomographie (MRT).

Aktuell werden zur Diagnosefindung die folgenden Schritte durchgeführt: klinische Untersuchung, MRT und quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) zum Nachweis von JCV-DNA im Liquor.

Die Sensitivität der JCV-DNA-PCR im Liquor zur Diagnose einer PML ist allerdings variabel und schwankt zwischen 60 und 95%.<sup>47,53</sup> Die meisten Laboratorien können JCV-DNA erst bei mehr als 200 Kopien pro ml im Liquor nachweisen, in einigen wenigen Laboratorien liegt die Nachweisgrenze aber auch bereits bei 10 Kopien JCV-DNA pro ml Liquor. Allerdings ist die Signifikanz eines Nachweises einer sehr niedrigen Anzahl von Kopien (< 100 Kopien/ml) nicht geklärt, denn es wurden bereits in früheren Untersuchungen in 2 von 515 Liquorproben von Patienten ohne klinische und radiologische Zeichen einer PML niedrige Mengen von JCV-DNA gefunden. Seit Juli 2011 wurden in 9,2% der PML Fälle in Deutschland, welche mit einer Therapie mit monoklonalen Antikörpern assoziiert waren, eine Hirnbiopsie zur Diagnosesicherung durchgeführt.

Folglich ist die Entwicklung zusätzlicher diagnostischer Untersuchungen zur Bestätigung von PML-Verdachtsfällen nötig. Bereits in früheren Untersuchungen konnte sowohl bei NAT-PML Fällen, als auch bei nicht-MS PML Patienten, ein deutlicher Anstieg der intrathekalen Produktion von Anti-JCV-IgG nachgewiesen werden. Ziel dieser Arbeit war es daher zu beurteilen, ob der Liquor-JCV-Antikörperindex (AI<sub>JCV</sub>) für die Diagnose einer NAT-PML geeignet ist. Des Weiteren wurde untersucht, ob sich die PML-Gruppe in der Art der produzierten Antikörpersubklassen und der Affinität der Antikörper von den untersuchten Kontrollgruppen unterscheidet und sich hieraus ein Hinweis darauf ergeben könnte, warum Patienten eine PML entwickeln. Als dritten Punkt gab es aus Voruntersuchungen Hinweise darauf, dass es mit der Manifestation der PML nicht nur zu Anstiegen der JCV-Antikörper, sondern auch zu Anstiegen und Serokonversionen der Antikörper gegen das verwandte humane Polyomavirus BK kommen kann. Dazu wurde untersucht, ob es sich dabei um kreuzreaktive JCV-Antikörper handeln könnte.

# 2 Material und Methoden

## 2.1 Patientenmaterial

In der Studie wurden Serum- und Liquorproben von fünf verschiedenen Patientengruppen ausgewertet und miteinander verglichen. Das Patientenkollektiv setzte sich zusammen aus:

1. Patienten, die unter Natalizumab eine PML entwickelt hatten („PML unter Natalizumab“) (n = 26)
2. Patienten, die aus anderen Gründen eine PML entwickelt hatten („PML ohne Natalizumab“) (n = 16)
3. Patienten, welche mit Natalizumab behandelt wurden, ohne eine PML zu entwickeln („Natalizumab ohne PML“) (n = 58)
4. Patienten ohne Natalizumabbehandlung und ohne PML mit erhöhtem MRZ („MRZ positiv“) (n = 18)
5. Patienten ohne Natalizumabbehandlung und ohne PML mit normalem MRZ („MRZ normal“) (n = 22)

In den Gruppen unter Punkt 1 und Punkt 2 wurden zum Teil Proben im zeitlichen Verlauf ausgewertet. Im Durchschnitt wurden in der Gruppe „PML mit Natalizumab“ 2,125 Serum- und Liquor-Paare pro Patient ausgewertet. In der Gruppe „PML ohne Natalizumab“ waren es im Durchschnitt pro Patient 1,33. Ein fester zeitlicher Abstand zwischen den Proben war nicht definiert, vielmehr handelt es sich um Proben, die im Zuge von Kontrolluntersuchungen der betroffenen Patienten gewonnen wurden. Um eine Auswertung zu ermöglichen, wurden die Proben daher in die Subgruppen „DX“ für das erste verfügbare Serum- und Liquorpaar, „DX1“ für die erste Folgeuntersuchung und „DX2“ für die zweite Folgeuntersuchung eingeteilt. Darüber hinaus vorhandene Folgeproben wurden der Gruppe „DX2“ zugeteilt. Eine gesonderte Auswertung erschien aufgrund der geringen Anzahl nicht sinnvoll.

Eine Genehmigung zur Verwendung des Patientenmaterials durch die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität liegt vor (Studennummer 3315, 13.06.2012).

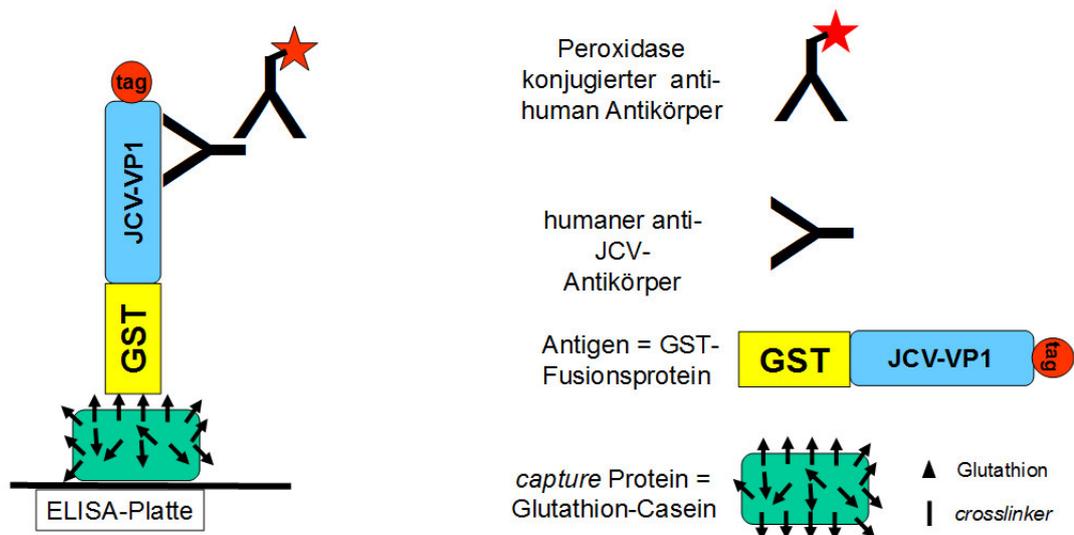
## 2.2 Rekombinanter JCV-BKV-IgG-ELISA

### 2.2.1 Prinzip

Beim rekombinanten JCV-BKV-IgG-*enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) handelt es sich um ein enzymatisches Immunadsorptionsverfahren (*EIA*).

Hierbei wird auf einer Mikrotiterplatte ein Glutathion-Casein-Komplex aufgebracht. An diesen kann das spezifische Antigen des gesuchten Antikörpers mittels einer Glutathion-S-Transferase gebunden werden. Ungebundenes Antigen wird entfernt. Anschließend wird das Probenmaterial auf die Platte aufgetragen und die eventuell enthaltenen, spezifischen Antikörper binden an das Antigen. Das Probenmaterial wird entfernt und die Platte gewaschen. Dabei werden unspezifische Antikörper entfernt und es verbleiben nur stabil am Antigen gebundene Antikörper auf der Reaktionsplatte. Zur Bestimmung der gebundenen Antikörpermenge wird ein Peroxidase markierter Zweitantikörper aufgetragen, welcher gegen den Fc-Teil humaner Antikörper gerichtet ist und an die auf der Reaktionsplatte befindlichen Antikörper bindet (vgl. Abb. 2.1). Zum Schluss wird ein Chromogen aufgetragen, welches durch die Peroxidase in seiner Struktur verändert und so in den jeweiligen Farbstoff umgewandelt wird.

Die Auswertung erfolgt durch Messung der Farbveränderung, einer definierten Farbstoffmenge in einer definierten Zeit, durch photometrische Messung.



**Abb. 2.1:** Schematische Darstellung des Prinzips des verwendeten ELISA am Beispiel des JCV. An der ELISA-Platte wird ein Glutathion-Casein-Komplex gebunden und dient als „capture Protein“, an welchem das Glutathion-S-Transferase (GST) gebundene Antigen anlagern kann. In der Probe vorhandene Antikörper binden an das Antigen und werden mittels Peroxidase konjugiertem anti-human Antikörper markiert. Modifizierte Abbildung nach P. Sehr et al: J Immunol Meth 253 (2001)153-162.

## 2.2.2 Gewinnung von rekombinantem Protein VP-1

### IPTG-Induktion von chemisch kompetenten *E. coli* zur Antigengewinnung:

#### Material

- *E. coli* BL21 (*GE Healthcare*)
  - *lysogeny broth* (LB) -Medium
  - Ampicillin (Amp)
  - Roche Inhibitor Cocktail Complete 25x Nr: 11 697 498 001 (20 Tabletten): 1 Tablette in 2 ml Aqua bidest.
  - Lysis-Puffer
 

1 Molar Tris pH 8.0	25 ml	40 mM
NaCl (MW 58,4)	11,68 g	200 mM
DTT (MW 154)	0,308 g	2 mM
EDTA (0,5 M)	2 ml	1 mM
aqua dest (ad)	1 l	

Frisch zugeben: 25x Roche Protease Inhibitor Cocktail Complete (z.B. 400 µl/10 ml)
  - Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) (Applichem A1008, MW 238) 1 M
  - Adenosine 5'triphosphate disodium salt (ATP, MW 551) Sigma No. A7699 100 µM
  - MgCl<sub>2</sub> (MW 95,21) 2 M
- Die Lagerung der Aliquots erfolgte bei  $-20^{\circ}\text{C}$

#### Durchführung

Zur Gewinnung von Antigen wurden chemisch kompetente, transformierte *E. coli* BL21 auf *lysogeny broth* (LB) -Medium mit Ampicillin inkubiert, bis die optische Dichte gemessen bei 600nm ( $\text{OD}_{600\text{nm}}$ ) 0,3 bis 0,5 betrug. Dann erfolgte die Zugabe von 0,25 mM IPTG und eine sechsstündige Inkubation auf dem Schüttler bei  $30^{\circ}\text{C}$ . Nach dieser Inkubationsphase wurden die Bakterien in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und 30 Minuten bei 4000 Umdrehungen pro Minute (*rpm*) und  $4^{\circ}\text{C}$  (Eppendorf 5810 R, blaue Einsätze für 50 ml *Tubes*) zentrifugiert.

Alternativ können auch 500 ml *Tubes* für den Rotor JA-10 verwendet und in der Beckmann Avanti-JE zentrifugiert werden.

Die Zellpellets wurden anschließend mit 10 ml Lysispuffer und Ultraschall zehn Minuten lysiert. Hierbei wurde ein Branson Sonifier 450 mit den Einstellungen *Output control* von 5,5 (entspricht ca. 25% Leistung, oder ca. 100 Watt) und einem *Duty cycle* von 50% verwendet.

Nach der Lyse erfolgte die Zugabe von 800 µl 100 mM ATP und 200 µl 1 M MgCl<sub>2</sub> und eine Inkubation über eine Stunde bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurde die Suspension 30 Minuten bei 30 000 g und  $4^{\circ}\text{C}$  (entspricht 15 000 *rpm* im SW32Ti) in Polyallomer-*Tubes* (25 × 89 mm, Beckmann No. 326823, max. 38 ml) zentrifugiert.

Der Überstand wurde in 50% (v/v) Glycerin (40 ml Suspension plus 40 ml Glycerin) aufgenommen und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Es wurde eine Bradford-Proteinbestimmung mit einer Vorverdünnung von 1:20 durchgeführt.

## Antigen-Bindung über Glutathion-Casein:

### Material

- Casein (Sigma C-5890)
- PBS
- N-Ethylmaleimide (NEM) (Pierce 23030): Stock soll = 20 mM in trockenem DMSO
- Sulfo-SMPB (Sulfosuccinimidyl 4-[p-maleimidophenyl]butyrate) (Pierce 22317)
- PD10 *column* Einwegsäulen zur Entsalzung (Amersham 17-0851-01)
- Glutathione (Sigma G-6013)
- EDTA

### Durchführung

Die Bindung des Antigens erfolgte mittels Glutathion-Casein. Hierzu wurde Casein bei 37 °C in PBS gelöst. Zur Derivatisierung des Cysteins im Casein wurde die Lösung mit NEM (Zielkonzentration = 0,4 mM) 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bindung des Crosslinkers an das Casein erfolgte durch 30 minütige Inkubation mit Sulfo-SMPB (Zielkonzentration = 4,36 mM). Die Lösung wurde anschließend, zur Entfernung der Präzipitate, fünf Minuten bei 6000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels PD10 Einwegsäulen zur Entsalzung von freiem Sulfo-SMPB befreit. Anschließend erfolgte die Anbindung von Glutathion an das Casein-*maleimidophenylbutyrate* (MPB). Dazu wurde die Casein-Lösung mit Glutathion-Lösung (120 mM in PBS + 10 mM EDTA, eingestellt auf pH 7.4 mit NaOH, letzte Konzentration 20 mM) eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Das freie Glutathion wurde nach diesem Schritt mit PD10 entfernt und die verbliebene Lösung aliquotiert.

Die Aufbewahrung der Aliquots erfolgte bei -20 °C. Häufiges Auftauen und Einfrieren wurde vermieden.

## 2.2.3 Anti-JCV-/Anti-BKV-IgG-ELISA

### Material

- Nunc 96 Well Polysorb Platten (während der Versuchsreihe wurde auf Maxisorbplatten umgestellt)
- Casein Blockierungspuffer:
 

Casein (Sigma C-5890)	0,2 g	(0,2%)
Tween 20	50 µl	(0,05%)
Phosphate buffered saline (PBS)	100 ml	
- Carbonat Puffer pH 9,6 (Beschichtungspuffer):
 

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,59 g
NaHCO <sub>3</sub>	2,93 g
aqua dest (a.d.)	1000 ml
- Waschpuffer:
 

PBS	1000 ml
Tween 20	5 ml
- Rekombinantes Protein VP-1 JCV und BKV (Standards siehe Abb. 2.2 )
- Anti Human IgG Peroxidase (Sigma No. A 0293)
- Tetramethylbenzidine (BD OptEIA, Nr. 555214)
- Stopplösung (1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

	JCV (AU/ml)	BKV (AU/ml)	Verd. (1:)	ml/aliq uot	Anzahl	Gesamt vol.(ml)	Privigen (ml)	Block- Puffer
<b>STD 1</b>	1000	2000	120	1,1	21	23,1	<b>0,1925</b>	<b>22,91</b>
<b>STD 2</b>	250	500	480	1,1	21	23,1	<b>0,0481</b>	<b>23,05</b>
<b>STD 3</b>	62,5	125	1920	1,1	21	23,1	<b>0,0120</b>	<b>23,09</b>
<b>STD 4</b>	15,6	31,3	7680	1,1	21	23,1	<b>0,0030</b>	<b>23,10</b>

Abb. 2.2: Standards für JCV- und BKV-Antikörpermessung

### Durchführung

Zur Durchführung des rekombinanten JC-BK-Virus ELISA wurden 96 Well Maxysorbplatten (Nunc) mit einem Puffer aus 150 µl Glutathion-Casein und 50 mM Carbonatpuffer pH 9,6 über Nacht bei 4 °C beschichtet. Die eingestellte Konzentration des Glutathion-Caseins im Puffer betrug dabei 1,33 µg/ml. Zu Beginn der Untersuchungen wurden Polysorbplatten der Firma Nunc verwendet, welche sich den Maxysorbplatten jedoch nicht als überlegen herausstellten. Die erzielten Ergebnisse waren mit letztgenannten Platten stabiler, sodass für die weiteren Messungen eine Umstellung auf Maxysorbplatten erfolgte. Am nächsten Tag wurden die Platten ausgeschlagen und mit 180 µl/Well Caseinblockierungspuffer über eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend folgte ein dreimaliges Waschen, wonach die Platten sowohl direkt verwendet, als auch luftdicht bei 4 °C eingelagert werden konnten. In einem nächsten Schritt wurden die vorbeschichteten Mikrotiterplatten mit 100 µl/Well rekombinantes Protein versehen, wobei die Konzentration in Casein Blockierungspuffer 250 µg/ml betrug. Die Inkubation wurde anschließend bei 4 °C über Nacht durchgeführt. Gleichzeitig wurden 5 µl der verwendeten Kontrollen und Proben in 95 µl Casein-Blockpuffer mit gelöstem Antigen (pMAL JCV und pMAL BKV) 1:20 vorverdünnt und ebenfalls über Nacht bei 4 °C inkubiert (siehe Tabelle 2.1). Hierbei wurden jeweils die für die Bestimmung von

## 2 Material und Methoden

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	STD1	95 µl	pMAL-JCV										
B	STD2	95 µl											
C	STD1	95 µl											
D	STD2	95 µl											
E	STD1	95 µl	pMAL-BKV										
F	STD2	95 µl											
G	STD3	95 µl											
H	STD4	95 µl											

**Tabelle 2.1: Pipettierschema der Vorverdünnungsplatte für pMAL JCV und pMAL BKV.** Es wurden jeweils 5 µl der verwendeten Kontrollen und Proben in 95 µl Casein-Blockpuffer mit gelöstem Antigen (pMAL JCV und pMAL BKV) 1:20 vorverdünnt. Eine Verdünnung der Standards erfolgte nicht.

JCV-IgG vorgesehenen Proben mit BKV-Antigen versehen und umgekehrt. Dies ermöglichte die Messung spezifischer Antikörper gegen JCV und BKV.

Nach erneutem dreimaligem Waschen der Platten wurden primärer Antikörper (Standards) und Probenmaterial aufgetragen und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Dabei wurden die verwendeten Standards unverdünnt, die Kontrollen und Proben entsprechend dem Belegungsschema 1:60 und 1:180 auf der Mikrotiterplatte weiter mit Casein-Blockierungspuffer verdünnt aufgetragen. Als Kontrollen wurden rekombinant hergestellte Antigene verwendet, welche in hochpositiver (*HPOS*), mittlerer (*MPOS*) und niedrigpositiver (*LPOS*) Verdünnung vorlagen. Als Negativkontrolle wurde *aqua dest* verwendet (vgl. Tabelle 2.2).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	STD1	HPOS	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	JCV
B	STD2	MPOS	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	
C	STD3	HPOS	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	
D	STD4	MPOS	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	
E	STD1	HPOS	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	BKV
F	STD2	MPOS	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	
G	STD3	HPOS	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	
H	STD4	MPOS	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	

**Tabelle 2.2: Belegungsschema der Reaktionsplatte.** Die gemessene OD<sub>450</sub> der Standards 1 bis 4 wurden als 1000 AU/ml, 250 AU/ml, 62,5 AU/ml und 15,6 AU/ml für JCV und 2000 AU/ml, 500 AU/ml, 125 AU/ml und 31,3 AU/ml für BKV definiert. Als Kontrollen wurden Verdünnungen eines Immunglobulinpräparats verwendet, welche in hochpositiver (*HPOS*), mittlerer (*MPOS*) und niedrigpositiver (*LPOS*) Konzentration vorlagen. Als Negativkontrolle wurden *aqua dest* verwendet. Die Patientenproben wurden jeweils in einer Verdünnung von 1:60 und 1:180 aufgetragen.

Auf die Inkubation folgte ein weiterer dreimaliger Waschschrift und das Auftragen von 100 µl/*Well* des Peroxidase Antikörpers in einer 1:20 000 Verdünnung in Casein-Blockpuffer, sowie eine weitere Inkubation bei 37 °C über eine Stunde. Nach dieser folgte erneut ein dreimaliger Waschschrift. Zur Auswertung wurde Tetramethylbenzidin gemäß der Herstellerangaben verwendet, wobei 100 µl/*Well* für acht Minuten auf die Mikrotiterplatten gegeben und die Reaktion im Anschluss mit 50 µl 1 M Schwefelsäure gestoppt wurde. Die photometrische Auswertung erfolgte bei 450 nm mittels Magelan ELISA-Reader. Die Referenzwelle wurde auf 600 nm eingestellt. Die gemessene OD<sub>450</sub> der Standards 1 bis 4 wurden als 1000 AU/ml (*arbitrary*

*units* pro Milliliter), 250 AU/ml, 62,5 AU/ml und 15,6 AU/ml für JCV und 2000 AU/ml, 500 AU/ml, 125 AU/ml und 31,3 AU/ml für BKV definiert.

Die statistische Auswertung erfolgte mit one-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni post-Test mittels der Software GraphPad Prism v5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

## 2.2.4 Rekombinanter JCV-IgG-Subklassen-ELISA

### Material

- Nunc 96 Well Maxisorb Platten
- Casein Blockierungspuffer:
 

Casein (Sigma C-5890)	0,2 g	(0,2%)
Tween 20	50 $\mu$ l	(0,05%)
Phosphate buffered saline (PBS)	100 ml	
- Carbonat Puffer pH 9,6 (Beschichtungspuffer):
 

$\text{Na}_2\text{CO}_3$	1,59 g
$\text{NaHCO}_3$	2,93 g
aqua dest (a.d.)	1000 ml
- Waschpuffer:
 

PBS	1000 ml
Tween 20	5 ml
- Rekombinantes Protein VP-1 JCV
- Mouse Anti-Human IgG<sub>1</sub> Horseradish Peroxidase ( $\gamma_1$ -Ketten spezifisch) (Southern Biotech, Cat. No. 9052-05)
- Mouse Anti-Human IgG<sub>2</sub> Horseradish Peroxidase ( $\gamma_1$ -Ketten spezifisch) (Southern Biotech, Cat. No. 9070-05)
- Mouse Anti-Human IgG<sub>3</sub> Horseradish Peroxidase ( $\gamma_1$ -Ketten spezifisch) (Southern Biotech, Cat. No. 9210-05)
- Mouse Anti-Human IgG<sub>4</sub> Horseradish Peroxidase ( $\gamma_1$ -Ketten spezifisch) (Southern Biotech, Cat. No. 9200-05)
- Tetramethylbenzidine (BD OptEIA, Nr. 555214)
- Stopplösung (1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ )

### Durchführung

Die Versuchsdurchführung der IgG-Subklassen in den Serum- und Liquorproben erfolgte analog zur Durchführung des rekombinanten JC-BK-Virus ELISA; abweichend wurden die Mikrotiterplatten nur mit JCV-VP-1 vorbeschichtet und die Proben mit löslichem VP-1-BKV in Caseinpuffer verdünnt. Auf die Mikrotiterplatten wurden die Proben vierfach, jeweils in Verdünnungen von 1:60 und 1:180 aufgetragen. Statt des im rekombinanten ELISA verwendeten anti-Human-IgG wurden 100  $\mu$ l/well spezifischer Antikörper gegen IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> und IgG<sub>4</sub> in einer 1:20 000 Verdünnung in Casein-Blockpuffer als Konjugat auf die Platten gegeben und für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Platten erneut dreifach gewaschen und 100  $\mu$ l/well Tetramethylbenzidin als Substrat aufgetragen. Nach acht Minuten wurde die Reaktion mit 50  $\mu$ l/well 1 M Schwefelsäure gestoppt und photometrisch ausgewertet.

Die statistische Auswertung erfolgte mit *one-way ANOVA* mit anschließendem Bonferroni *post-Test* mittels der Software GraphPad Prism v5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

## 2.2.5 Affinitätsmessungen mittels rekombinantem JCV-IgG-ELISA

### Prinzip

Nach der reinen quantitativen Messung der in den verschiedenen Versuchsgruppen gebildeten Antikörper wurde versucht, qualitative Unterschiede mit Hilfe von Affinitätsmessungen zu detektieren. Dazu wurden erneut Mikrotiterplatten mit JCV-VP-1-Antigen beschichtet und die Testseren und Liquores im Doppelansatz aufgetragen. Im Anschluss wurde in einem der beiden Ansätze versucht, die an den Antigenen auf der Mikrotiterplatte gebundenen IgG-Antikörper mit Hilfe von in Lösung befindlichem Antigen abzulösen. Bei niedriger Affinität wäre nach dem Entfernen des löslichen Antigens und eines Waschschruttes eine im direkten Vergleich zum zweiten Ansatz reduzierte Menge an Antikörper auf der Mikrotiterplatte zu erwarten gewesen.

Die gemessenen Antikörpermengen wurden prozentual mit einander ins Verhältnis gesetzt.

### Material

- Nunc 96 Well Maxisorb Platten
- Casein Blockierungspuffer:

Casein (Sigma C-5890)	0,2 g	(0,2%)
Tween 20	50 µl	(0,05%)
Phosphate buffered saline (PBS)	100 ml	
- Carbonat Puffer pH 9,6 (Beschichtungspuffer):

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,59 g
NaHCO <sub>3</sub>	2,93 g
aqua dest (a.d.)	1000 ml
- Waschpuffer:

PBS	1000 ml
Tween 20	5 ml
- Rekombinantes Protein VP-1-JCV und VP-1-BKV Anti-Human IgG Peroxidase (Sigma No. A 0293) Tetramethylbenzidine (BD OptEIA, Nr. 555214) Stopplösung (1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	STD1	HPOS	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	Affinität
B	STD2	MPOS	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	
C	STD3	HPOS	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	
D	STD4	MPOS	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	
E	STD1	HPOS	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	Kontrollen
F	STD2	MPOS	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	
G	STD3	HPOS	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	
H	STD4	MPOS	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	

Tabelle 2.3: Belegungsschema der Reaktionsplatte

### Durchführung

Die Beschichtung der Mikrotiterplatten erfolgte analog zur oben beschriebenen Beschichtung im JCV-BKV-ELISA, wobei das Belegungsschema geändert wurde (siehe Tabelle 2.3) und keine Beschichtung der Platten mit BKV-VP-1-Antigen erfolgte. Alle Proben wurden mit löslichem BKV-VP-1-Antigen vorbehandelt, um kreuzreaktive BKV-Antikörper zu entfernen. Hierzu wurden 5  $\mu$ l der verwendeten Kontrollen und Proben in 95  $\mu$ l Casein-Blockpuffer mit gelöstem Antigen pMAL BKV 1:20 vorverdünnt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden 50  $\mu$ l der Kontrollen und Proben, sowie die unverdünnten Standards auf die gewaschene Reaktionsplatte aufgetragen (vgl. Tabelle 2.3). Die weitere Versuchsdurchführung erfolgt analog zum JCV-BKV-IgG-ELISA.

Zur Auswertung wurden die Antikörpermengen des Ansatzes bei dem ein Löseversuch durchgeführt wurde, durch die Antikörpermengen des zweiten Ansatzes geteilt. Die erhaltenen, prozentualen Angaben wurden mittels *one-way ANOVA* mit Bonferroni *post-Test* miteinander verglichen (GraphPad Prism v5.0, GraphPad Software, San Diego, CA).

## 2.3 MRZ-Reaktion/Reiber-Index

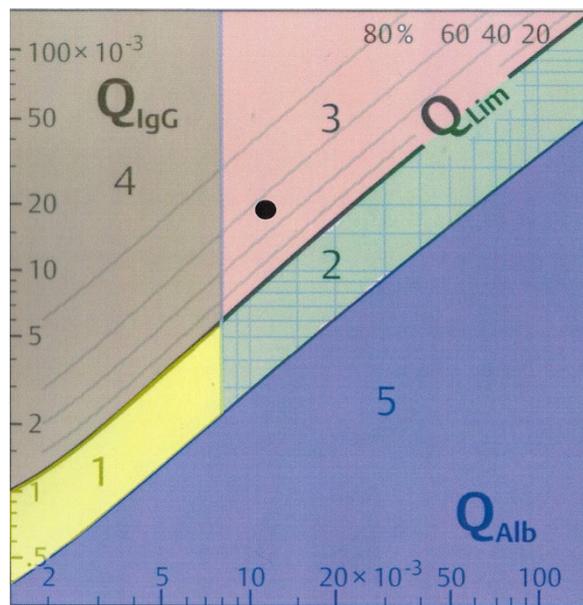
Zur Berechnung des Reiberindex und der MRZ-Reaktion wurden den Patienten Liquor- und Blutproben entnommen, wobei Lumbalpunktion und Blutentnahme zeitnah erfolgten. Im Zentrallabor des Universitätsklinikums Düsseldorf wurden Gesamt-IgG und Albumin, im Institut für Virologie des Universitätsklinikums Düsseldorf wurden IgG gegen Masern, Röteln und Varizellen bestimmt. Die Messungen erfolgten automatisiert mittels serologischen ELISA-Testen der Firma Euroimmun auf dem Automaten IP-2 der selben Firma.

Zur Messung der spezifischen Antikörper erfolgte eine standardmäßige Verdünnung der Serumproben 1:404 und 1:1616 und der Liquorproben 1:2 und 1:6.

Für den Reiber-Index wurde der Limes-Quotient ( $LSQ_{lim}$ ) wie folgt berechnet:

$$LSQ_{lim} = 0,93 \sqrt{(LSQ_{Alb.})^2 + 6 \cdot 10^{-6}} - 1,7 \cdot 10^{-3}$$

Die Auswertung erfolgte mittels des Reiber-Diagramms (vgl. Abb. 2.3).



**Abb. 2.3: Reiber-Diagramm.** Aufgetragen sind Gesamt-IgG Liquor / Gesamt-IgG Serum als  $Q_{IgG}$  sowie Albumin Liquor / Albumin Serum als  $Q_{Alb}$ . 1: Normalbereich, 2: Schrankenstörung, 3: Schrankenstörung und IgG-Synthese, 4: IgG-Synthese, 5: Messfehler. Abbildung modifiziert nach EUROIMMUN-Präsentation „Liquordiagnostik“ 2011.

Die MRZ-Reaktion wurde berechnet in dem zunächst der erregerspezifische LSQ ( $LSQ_{Err.spez.}$ ) bestimmt wurde:

$$LSQ_{Err.spez.} = \frac{\text{Einheiten (Liquor)} \times \text{Verdünnungsfaktor (Liquor)}}{\text{Einheiten (Serum)} \times \text{Verdünnungsfaktor (Serum)}}$$

Anschließend wurden  $LSQ_{ges.}$  und  $LSQ_{lim}$  verglichen und der  $LSQ_{spez.}$  berechnet.

Dabei galt für  $LSQ_{ges} < LSQ_{lim}$ :

$$LSQ_{rel} = \frac{LSQ_{Err.spez.}(IgG)}{LSQ_{ges.}(IgG)}$$

und für  $LSQ_{ges} > LSQ_{lim}$ :

$$LSQ_{rel} = \frac{LSQ_{Err.spez.}(IgG)}{LSQ_{lim}(IgG)}$$

Ein  $LSQ_{rel} < 1,3$  wurde als Normalbereich, ein  $LSQ_{rel}$  von 1,3 bis 1,5 als Grenzwertbereich und ein  $LSQ_{rel} > 1,5$  als Hinweis auf erregerspezifische Antikörperproduktion im ZNS gewertet.

## 2.4 Proteinbestimmung nach Bradford

### Material

- Nunc 96 Well Maxisorb Platten
- Bradford-Reagenz
- Proteinstandards á 1 ml mit 0, 20, 40, 60, 80, 120  $\mu\text{g}/\text{ml}$  BSA
- Aqua dest
- Proben 1:20 und 1:40 vorverdünnt in *aqua dest*

### Durchführung

Zu Beginn wurde die Bradfordlösung 1:5 in *aqua dest* vorverdünnt. In jedes *Well* der Mikrotiterplatte wurden dann 200  $\mu\text{l}$  dieser Bradford-Reagenz vorgelegt und pro *Well* 50  $\mu\text{l}$  Standard bzw. Probe hinzugegeben. Alle Standards und Proben wurden im Doppelansatz bestimmt. Die Auswertung der Farbreaktion erfolgte im Magelan ELISA-Reader.

## 2.5 Quantitative Real Time PCR

### Prinzip

Um den Gehalt an Virus-DNA im Patientenmaterial beurteilen zu können, wurde das Verfahren der quantitativen *Real-time*-PCR angewandt. Dabei wird dem Reaktionsgemisch eine Sonde hinzugefügt, welche am 5' Ende mit einem fluoreszierenden *Reporter*-Farbstoff versehen ist (6-Carboxy-Fluorescein, *FAM*). Das 3' Ende ist gleichzeitig mit einem *Quencher*-Farbstoff markiert (*TAMRA*), welcher die Fluoreszenz des Reporters unterdrückt (vgl. Tabelle 2.5). In der *Annealingphase* hybridisiert die zur Matrize komplementäre Sonde an die zu amplifizierende DNA und wird während der Extensionsphase von der Taq-Polymerase abgespalten. Dabei kommt es zu einer räumlichen Trennung von *Quencher* und *Reporter* und mit Hilfe einer CCD-Kamera kann das Fluoreszenzsignal des Reporters gemessen werden. Die Auswertung erfolgt anhand der Kinetik des Signalanstiegs, welches von der Menge der zu Beginn der Amplifikation vorhandenen Matrize abhängt.

### Material

- Primer: Biomers.net

JCV:

Sense-Primer:

JCV-1-F; T<sub>m</sub> = 53 °C

5'-aga gtg ttg gga tcc tgt gtt tt-3'

Anti-Sense-Primer:

JCV-2-R; T<sub>m</sub> = 55 °C

5'-gag aag tgg gat gaa gac ctg ttt-3'

BKV:

Sense-Primer:

BK100F; T<sub>m</sub> = 55 °C

5'-ggg act gta ac acct gct ctt ga-3'

Anti-Sense-Primer:

BK173R, T<sub>m</sub> = 54 °C

5'-ctg ccc ctg gac act ctc c-3'

- TaqMan PCR Sonden:

JCV:

JCV-BHQ-1

FAM-tca tca ctg gca aac att tct tca tgg c-BHQ-1

BKV:

BKV-Tamra

FAM-cat atg aag atg gcc cca aac aaa aga aa-TAMRA

- Mastermix

Univesal MasterMix (Applied Biosystems)	25 µl
JCT-1-F	0,15 µl
JCT-1-R	0,15 µl
BK100F	0,15 µl
BK173R	0,15 µl
JCV-BHQ-1	0,10 µl
BKV-Tamra	0,10 µl
Aqua dest	14,6 µl
40 µl/Well	

## Durchführung

Der Reaktionsansatz wurde in die *Wells* pipettiert und auf einer Sicherheitswerkbank mit 10 µl/Well Probe versehen. Dabei wurden in die ersten drei *Wells* eines Ansatzes Standards mit einer definierten Anzahl JCV- und BKV-DNA-Kopien versehen, gefolgt von einer Negativkontrolle aus *Aqua dest*. Die verwendeten Standards enthielten hier jeweils 150 000, 15 000 und 1500 Kopien/ml. Die Amplifikation und Auswertung erfolgte mit dem *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System* nach dem unten aufgeführten PCR-Schema, wobei die Sammlung der Daten in den PCR-Schritten zwei und drei erfolgte (siehe Tabelle 2.4).

Die statistische Auswertung erfolgte erneut mittels *one-way ANOVA* mit Bonferroni *post-Test* (GraphPad Prism v5.0, GraphPad Software, San Diego, CA).

<i>Stage</i>	Temperatur	Zeit in Minuten	<i>Repeat</i>	<i>Ramp Rate</i>
1	50,0 °C	2:00	1	100
2	95,0 °C	10:00	1	100
3	95,0 °C	0:15	45	100
4	60,0 °C	1:00	1	100

**Tabelle 2.4: PCR-Zyklus, 9700 Mode, Datensammlung in den Schritten 2 und 3**

<i>Detector</i>	Reporter	Quencher	Threshold	Baseline Start	Baseline End
JC	FAM	TAMRA	0,105 049	3	15
BK	FAM	TAMRA	0,105 049	3	15

**Tabelle 2.5: JCV- und BKV-Sonden.** Spezifikationen der verwendeten Sonden.

# 3 Auswertung

## 3.1 ELISA

### 3.1.1 Anti-JCV-IgG

Die Antikörpermenge im Serum und im Liquor der Patienten gegen das JCV wurde mittels eines quantitativen ELISA gemessen (vgl. Tabelle 3.1). Dies diente anschließend als Grundlage für die Berechnung des JCV-Antikörper-Serum/Liquor Index ( $AI_{JCV}$ ).

Bei den Untersuchungen zeigte sich zwischen den Patientengruppen mit nachgewiesener aktiver JC-Virus Infektion eine deutlich gesteigerte anti-JCV-IgG Produktion im Vergleich mit den Kontrollgruppen ohne nachgewiesene PML; dieses Ergebnis fand sich sowohl im Serum als auch im Liquor. Bei dem Patientenkollektiv, welches unter Natalizumab eine PML entwickelt hatte ( $n = 26$ ), konnten im Serum im Mittel 99 000 U/ml IgG (95% CI 47 646 bis 150 354 U/ml) nachgewiesen werden, im Liquor 1752 U/ml (95% CI 507 bis 2997 U/ml).

Die Patientengruppe mit PML ohne Natalizumab ( $n = 16$ ) hatte im Mittel (MW) 73,125 U/ml (95% CI -45 245 bis 191 495 U/ml) IgG im Serum und 1608 U/ml (95% CI -646 bis 3862 U/ml) im Liquor. In den Kontrollgruppen wurden in der Gruppe mit Natalizumab ohne PML ( $n=58$ ) 6847 U/ml IgG (95% CI 4751 bis 9142 U/ml) im Serum und 0,5517 U/ml IgG (95% CI 0,0253 bis 1,078 U/ml) im Liquor gemessen. In der Gruppe mit erhöhtem MRZ ( $n=18$ ) fanden sich 5599 U/ml IgG (95% CI 1988 bis 9210 U/ml) im Serum, 42,28 U/ml IgG (95% CI -32,63 bis 117,2 U/ml) im Liquor und in der Gruppe mit normalem MRZ ( $n=22$ ) 30 346 U/ml IgG (95% CI 9971 bis 50 721 U/ml) im Serum und 72,41 U/ml IgG (95% CI -0,5814 bis 145,4 U/ml) im Liquor.

Es konnte gezeigt werden, dass die Messwerte für IgG im Serum der Gruppe mit „PML unter Natalizumab“ sich deutlich von denen in den Kontrollgruppen unterschieden. Im Vergleich der Mittelwerte (MW) im Serum von „PML unter Natalizumab“ (MW 99 000 U/ml) gegen mit „Natalizumab ohne PML“ (MW 6947 U/ml) ergab sich ein  $p$ -Wert  $\leq 0,001$ , gegenüber den Gruppen mit erhöhtem (MW 5599 U/ml) und normalem MRZ (MW 30 346 U/ml) von jeweils  $p \leq 0,05$ . Die beiden Gruppen mit PML-Patienten unterschieden sich nicht voneinander ( $p > 0,05$ ). Im Vergleich der „PML ohne Natalizumab“ (MW 73 125 U/ml) Gruppe mit den Kontrollgruppen konnte ebenfalls kein Unterschied gemessen werden (vgl. Abb. 3.1).

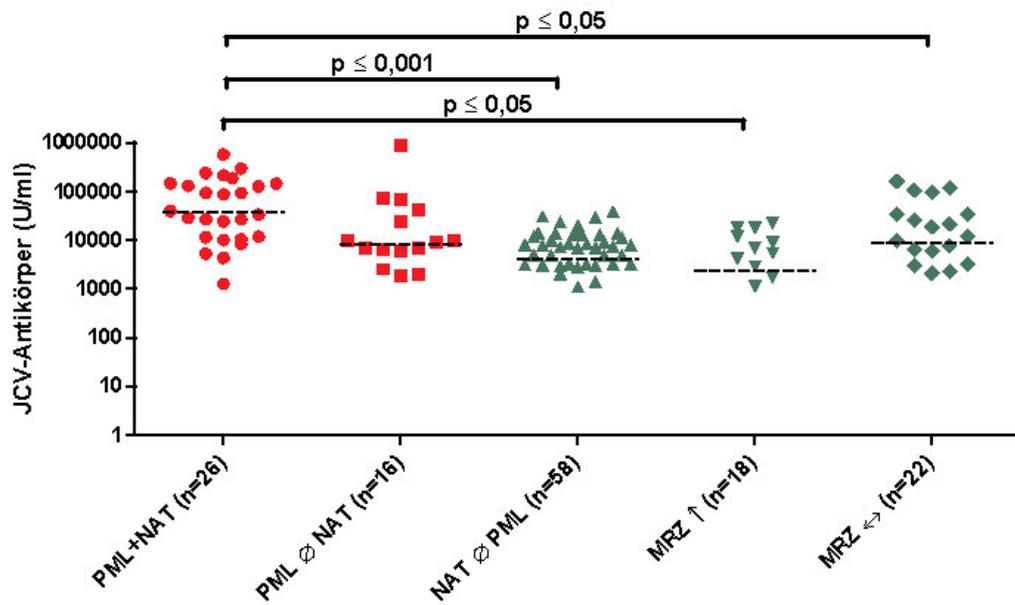
Im Vergleich der Mittelwerte im Serum von „PML unter Natalizumab“ gegen „Natalizumab ohne PML“ ergab sich ein  $p$ -Wert  $\leq 0,001$ , gegen die Gruppen mit erhöhtem und normalem MRZ von jeweils  $p \leq 0,05$ . Die beiden Gruppen mit PML-Patienten unterschieden sich nicht voneinander ( $p > 0,05$ ). Im Vergleich der

Patientengruppe	n <sub>JCV-positiv</sub> (%)	n <sub>JCV-negativ</sub> (%)	n <sub>gesamt</sub>
„PML unter Nat.“	26 (100)	0 (0)	26
„PML ohne Nat.“	15 (93,8)	1 (6,2)	16
„Nat. ohne PML“	41 (70,7)	17 (29,3)	58
„Erhöhter MRZ“	11 (61,1)	7 (38,9)	18
„Normaler MRZ“	18 (81,8)	4 (18,2)	22

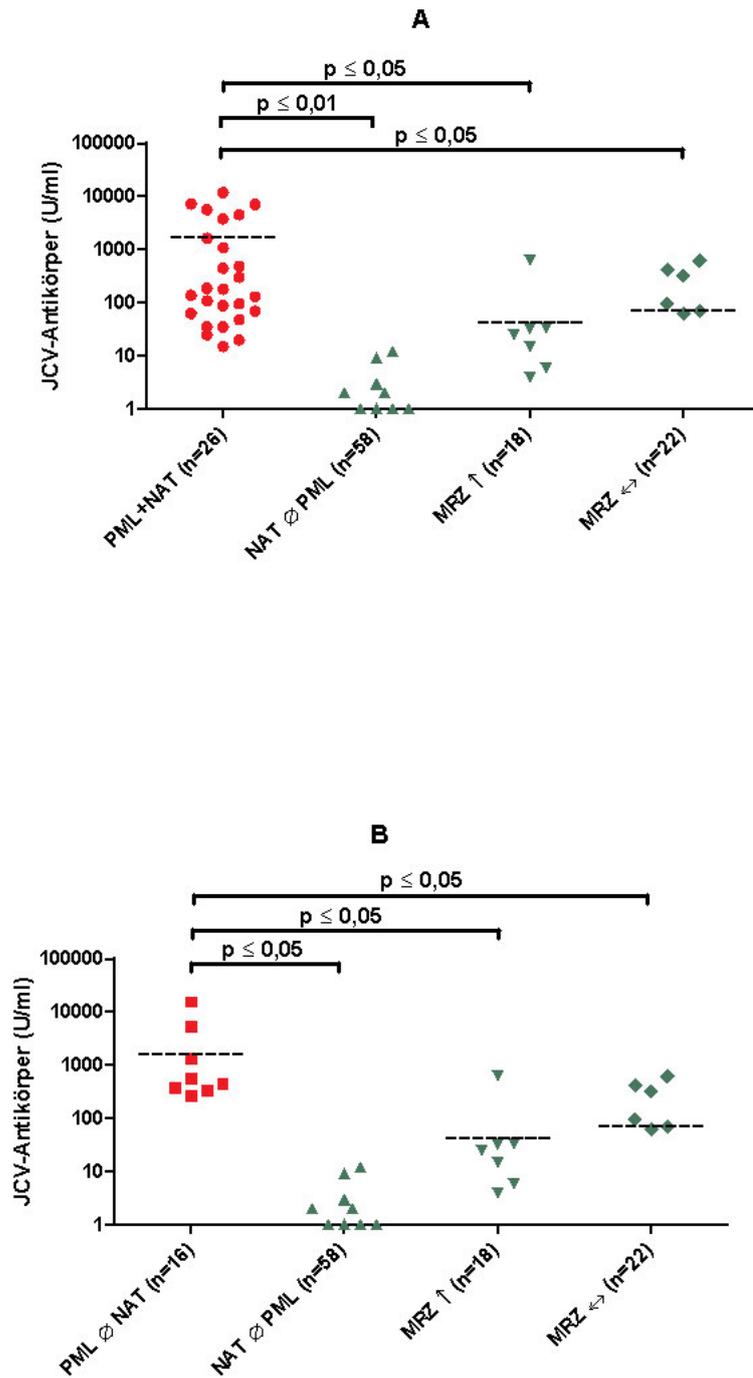
**Tabelle 3.1: Ergebnisse der Messungen von anti-JCV-Antikörpern.** Angegeben sind jeweils die Anzahl der Patienten mit positivem Antikörperbefund und mit negativem Antikörperbefund in den untersuchten Gruppen.

„PML ohne Natalizumab“ Gruppe mit den Kontrollgruppen konnte ebenfalls kein Unterschied gemessen werden.

Auch im Liquor wurden in den beiden PML-Gruppen gegenüber den drei Kontrollgruppen erhöhte anti-JCV-IgG-Werte gemessen. Im Vergleich ergab sich für die „PML unter Natalizumab“ Gruppe (MW 1752 U/ml) gegen die Gruppen „Natalizumab ohne PML“ (MW 0,5517 U/ml) und „normaler MRZ“ (MW 72,41 U/ml) ein  $p$ -Wert  $\leq 0,01$  und gegen die Gruppe mit erhöhtem MRZ (MW 42,28 U/ml) von  $p \leq 0,05$ . Bei der „PML ohne Natalizumab“ Gruppe (MW 1608 U/ml) im Vergleich mit allen drei Kontrollgruppen war der  $p$ -Wert  $\leq 0,05$ . Die beiden PML-Gruppen unterschieden sich hingegen wieder nicht voneinander ( $p > 0,05$ ).



**Abb. 3.1: Vergleich der JCV-IgG-Antikörperaktivität im Serum.** Die JCV-IgG-Antikörperaktivität (U/ml) im Serum der beiden PML-Patientengruppen (rote Punkte) im Vergleich mit den drei Patientengruppen die keine PML entwickelt haben (grüne Punkte).  $p \leq 0,05$  bezieht sich auf den Vergleich der Gruppe „PML mit Natalizumab“ mit den Gruppen „MRZ erhöht“ und „MRZ normal“.  $p \leq 0,001$  bezieht sich auf den Vergleich der Gruppe „PML mit Natalizumab“ und „Natalizumab ohne PML“



**Abb. 3.2:** Vergleich der Antikörperaktivität (U/ml) von JCV-IgG im Liquor. Vergleich der PML-Patientengruppen mit den Kontrollgruppen. A) Vergleich der Gruppe „PML mit Natalizumab“ (rote Punkte) mit den Patientengruppen ohne PML (grüne Punkte),  $p \leq 0,05$  bezieht sich auf den Vergleich der PML-Patienten mit Natalizumab mit den Patienten ohne PML und erhöhtem oder normalem MRZ und  $p \leq 0,01$  auf den Vergleich der PML-Patienten mit den Patienten, welche unter Natalizumab keine PML entwickelt hatten. B) Vergleich der Gruppe „PML ohne Natalizumab“ (rote Punkte) mit den Patientengruppen ohne PML (grüne Punkte),  $p \leq 0,05$  bezieht sich auf den Vergleich der Patienten, welche ohne Natalizumab eine PML entwickelt hatten, mit den Gruppen der Patienten ohne PML.

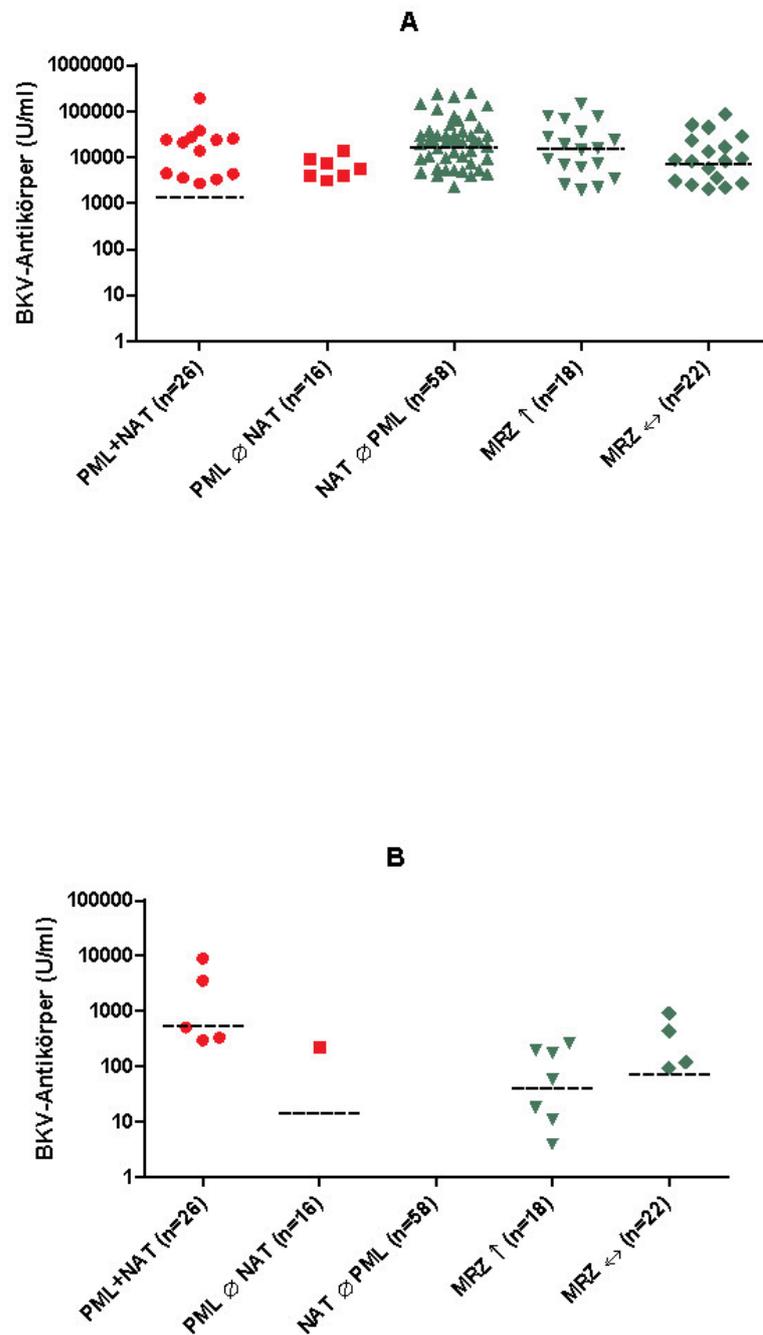
### 3.1.2 Anti-BKV-IgG

In den parallel durchgeführten Bestimmungen der anti-BKV-IgG-Mengen konnten keine Unterschiede zwischen den Gruppen gefunden werden ( $p > 0,05$ , vgl. Abb. 3.3). Es zeigte sich jedoch insgesamt, dass die Seroprävalenz bei den PML-Patienten bei 48%, die der Patienten ohne PML bei 86% lag (vgl. Tabelle 3.2). Hier ließ sich ein Signifikanzniveau von  $>99,99\%$  errechnen. Die *Odds Ratio* lag bei 0,1515, sodass davon auszugehen ist, dass der BKV-Serostatus Einfluss auf die Entwicklung einer PML hat.

Im Serum fanden sich in der Gruppe „PML mit Natalizumab“ im Mittel 14 746 U/ml (95% CI –478,8 bis 29 971 U/ml), in der Gruppe „PML ohne Natalizumab“ 2940 U/ml (95% CI 707,5 bis 5172 U/ml), in der Gruppe „Natalizumab ohne PML“ 34 665 U/ml (95% CI 19 962 bis 49 367 U/ml), in der Gruppe „MRZ erhöht“ 30 525 U/ml (95% CI 11 308 bis 49 742 U/ml) und in der Gruppe „MRZ normal“ 14 614 U/ml IgG (95% CI 5018 bis 24 210 U/ml). Im Liquor wurde in der Gruppe „Natalizumab ohne PML“ kein anti-BKV-IgG gefunden und auch in den restlichen Gruppen waren die Werte niedrig. In der Gruppe „PML mit Natalizumab“ konnten 530,2 U/ml (95% CI –227,2 bis 1288 U/ml) IgG nachgewiesen werden, in der Gruppe „PML ohne Natalizumab“ 13,88 U/ml (95% CI –15,69 bis 43,44 U/ml), in der Gruppe „MRZ erhöht“ 40,50 U/ml (95% CI –0,2995 bis 81,30 U/ml) und in der Gruppe „MRZ normal“ 71,36 U/ml IgG (95% CI –22,71 bis 165,4 U/ml).

	BKV pos. (%)	BKV neg. (%)	Summe
PML	20 (47,6)	22 (52,3)	42
Keine PML	84 (85,7)	14 (14,3)	98
Summe	104 (74,3)	36 (25,7)	140

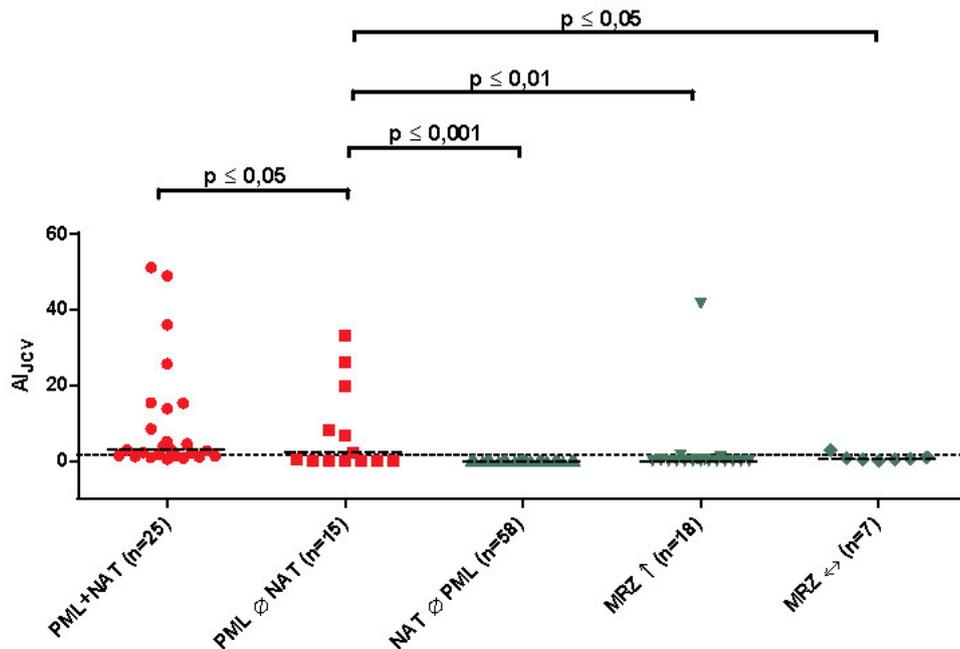
**Tabelle 3.2: Vierfelder Tafel zum Serostatus BKV.** Es wurde zwischen BKV positiven bzw. negativen und PML- und nicht-PML-Patienten unterteilt. In Klammern der prozentuale Anteil BKV positiver Patienten an der Gesamtzahl der PML-Patienten bzw. der Patienten ohne PML.  $p \leq 0,001$ , Odds Ratio: 0,1515.



**Abb. 3.3: Vergleich der Antikörperaktivität (U/ml) von BKV-IgG.** Aufgrund der logarithmischen Darstellungen der Antikörperaktivitäten von BKV-IgG sind Patienten ohne messbare Antikörper nicht dargestellt. A) Vergleich der gemessenen Antikörperaktivitäten (U/ml) der PML-Patientengruppen (rote Punkte) mit den Patientengruppen ohne PML (grüne Punkte) im Serum, B) Vergleich der gemessenen Antikörperaktivitäten (U/ml) der PML-Patientengruppen (rote Punkte) mit den Patientengruppen ohne PML (grüne Punkte) im Liquor. Es konnten im Vergleich der Gruppen weder im Serum noch im Liquor Unterschiede festgestellt werden.

### 3.1.3 Liquor/Serum-Quotient

Zur Klärung, ob sich der Quotient aus JCV-IgG in Liquor und Serum ( $AI_{JCV}$ ) zur Frühdiagnostik einer PML eignet und ob es sich bei den im Liquor gefundenen Antikörpern um im ZNS gebildete oder um aus dem Serum eindiffundierte Immunglobuline handelte, wurden die zuvor ermittelten IgG-Konzentrationen der einzelnen Patienten miteinander verrechnet. Hierbei erfolgte die einfache Teilung des Liquorwerts durch den Serumwert. Als *cut-off* wurde 1,5 gewählt, niedrigere  $AI_{JCV}$  wurden als normal gewertet (vgl. Tabelle 3.3). Es konnte gezeigt werden, dass sich die Quotienten der in der Gruppe „PML ohne Natalizumab“ gemessenen IgG-Spiegel signifikant von denen der anderen Gruppen unterschieden ( $p \leq 0,05$  bis  $p \leq 0,01$ ; vgl. Abb. 3.4). Im Mittel konnte hier ein  $AI_{JCV}$  von 2,17 errechnet werden (95% CI  $-3,958$  bis  $56,36$ ). Zwischen der Gruppe „PML mit Natalizumab“, bei der sich ein mittlerer  $AI_{JCV}$  von 2,99 (95% CI  $3,920$  bis  $16,13$ ) und den Kontrollgruppen ohne PML ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ( $p > 0,05$ ). In der Gruppe „Natalizumab ohne PML“ ergab sich genauso wie in der Gruppe „MRZ erhöht“ im Mittel ein  $AI_{JCV}$  von 0 wobei sich das 95%-Konfidenzintervall bei der Gruppe „Natalizumab ohne PML“ von  $0,003344$  bis  $0,03390$  und bei der Gruppe „MRZ erhöht“ von  $-2,355$  bis  $7,358$  erstreckte. In der Gruppe „MRZ normal“ wurde ein mittlerer  $AI_{JCV}$  von  $0,61$  errechnet (95% CI  $-0,003$  bis  $1,74$ ).

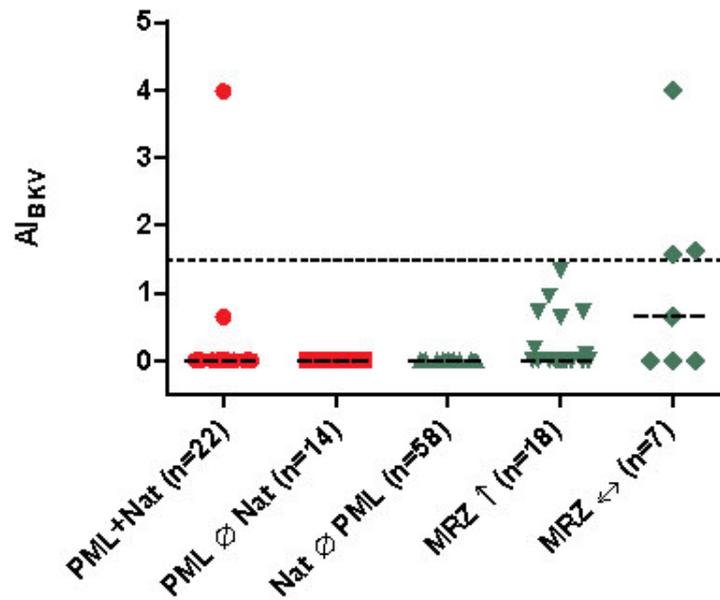


**Abb. 3.4:** Vergleich des  $AI_{JCV}$  zwischen den einzelnen Gruppen. Die Gruppe der Patienten mit PML ohne NAT unterschied sich hierbei von allen anderen Gruppen ( $p \leq 0,05$ ), während sich die gemessenen  $AI_{JCV}$  der Gruppe „PML mit Natalizumab“ nicht signifikant von denen der Gruppen ohne PML unterschieden ( $p > 0,05$ ). Als *cut-off* wurde 1,5 gewählt, niedrigere  $AI_{JCV}$  wurden als normal gewertet.

In den zum Vergleich durchgeführten Berechnungen des Liquor-Serum-BKV-Antikörperindex ( $AI_{BKV}$ , vgl. Tabelle 3.4) konnten keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden ( $p > 0,05$ ; vgl. Abb. 3.5). In den Gruppen 1 bis 4 lag der mittlere  $AI_{BKV}$  bei 0 (95% CI bei der Gruppe „PML mit Natalizumab“ von  $-1,224$  bis  $6,12$  und bei der Gruppe „MRZ erhöht“ von  $0,051$  bis  $0,468$ ). In der Gruppe „MRZ normal“ konnte ein  $AI_{BKV}$  von  $0,65$  errechnet werden (95% CI  $-0,2247$  bis  $2,465$ ).

Patientengruppe	$n_{AI_{JCV}} \text{ erhöht } (\%)$	$n_{AI_{JCV}} \text{ normal } (\%)$	$n_{\text{gesamt}} (\%)$
„PML unter Nat.“	17 (68)	8 (32)	25
„PML ohne Nat.“	8 (53,3)	7 (46,7)	15
„Nat. ohne PML“	0 (0)	58 (100)	58
„Erhöhter MRZ“	1 (5,6)	17 (94,4)	18
„Normaler MRZ“	1 (14,3)	6 (85,7)	7

**Tabelle 3.3: Ergebnisse der Berechnungen des  $AI_{JCV}$  in den Vergleichsgruppen.** Angegeben sind jeweils die Anzahl der Patienten mit positivem  $AI_{JCV}$  und mit negativem  $AI_{JCV}$  in den untersuchten Gruppen, als *cut-off* wurde 1,5 gewählt. Niedrigere  $AI_{JCV}$  wurden als normal gewertet.



**Abb. 3.5: Vergleich des relativen  $AI_{BKV}$  zwischen den einzelnen Gruppen.** Zwischen den verglichenen Gruppen konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede errechnet werden ( $p > 0,05$ ). Der *cut-off* wurde auf 1,5 festgelegt, niedrigere  $AI_{BKV}$  wurden als normal gewertet (gepunktete Linie). In der Gruppe „PML mit Nat“ liegen zwei Quotienten außerhalb des Graphen (11,51 und 37,72).

Patientengruppe	$n_{AI_{BKV}} \text{ erhöht } (\%)$	$n_{AI_{BKV}} \text{ normal } (\%)$	$n_{\text{gesamt}} (\%)$
„PML unter Nat.“	3 (13,6)	19 (86,4)	22
„PML ohne Nat.“	0 (0)	14 (100)	14
„Nat. ohne PML“	0 (0)	58 (100)	58
„Erhöhter MRZ“	0 (0)	18 (100)	18
„Normaler MRZ“	3 (42,9)	4 (57,1)	7

**Tabelle 3.4: Ergebnisse der Berechnungen des  $AI_{BKV}$  in den Vergleichsgruppen.** Angegeben sind jeweils die Anzahl der Patienten mit positivem  $AI_{BKV}$  und mit negativem  $AI_{BKV}$  in den untersuchten Gruppen, als *cut-off* wurde 1,5 gewählt. Niedrigere  $AI_{BKV}$  wurden als normal gewertet.

### 3.1.4 Anti-JCV-IgG Subklassen

In einem zweiten Schritt wurde in den Gruppen „PML mit Natalizumab“ und „PML ohne Natalizumab“ eine Anti-JCV-IgG Subklassenanalyse durchgeführt. Eine quantitative Bestimmung der Antikörpermengen war mangels Vergleichsstandards nicht möglich, bei den angegebenen Werten handelt es sich um die optische Dichte, gemessen bei 450nm ( $OD_{450nm}$ ). Es zeigte sich in beiden Gruppen ein Vorherrschen der Subklassen IgG<sub>1</sub> und IgG<sub>3</sub> sowohl im Serum als auch im Liquor. In der Gruppe „PML unter Natalizumab“ ( $n = 38$ ) waren diese Ergebnisse besonders deutlich ( $p \leq 0,001$ , bzw.  $p \leq 0,05$  beim Vergleich von IgG<sub>1</sub> mit IgG<sub>2</sub> und IgG<sub>4</sub>, vgl. Abb. 3.6 und Abb. 3.7). Im Mittel wurden für IgG<sub>1</sub> und IgG<sub>3</sub> eine  $OD_{450nm}$  von 0,9649 (95% CI 0,5786 bis 1,351) bzw. 2,701 (95% CI 2,492 bis 2,911) im Serum und 0,5341 (95% CI 0,2576 bis 0,8107) bzw. 1,708 (95% CI 1,319 bis 2,097) im Liquor gemessen. Für IgG<sub>2</sub> und IgG<sub>4</sub> ergaben sich hingegen im Mittel eine  $OD_{450nm}$  von 0,08218 (95% CI 0,06570 bis 0,09866) bzw. 0,04921 (95% CI 0,03599 bis 0,06243) im Serum und 0,06371 (95% CI 0,05001 bis 0,07741) bzw. 0,03368 (95% CI 0,02772 bis 0,03965) im Liquor.

Die Ergebnisse in der Gruppe „PML ohne Natalizumab“ ( $n = 11$ ) waren vergleichbar (im Serum:  $p \leq 0,001$ , bzw.  $p \leq 0,01$ , im Liquor  $p \leq 0,05$ , vgl. Abb. 3.8). Hier wurden im Mittel für IgG<sub>1</sub> und IgG<sub>3</sub> eine  $OD_{450nm}$  von 0,5048 (95% CI 0,1075 bis 0,9021) und 1,583 (95% CI 0,7854 bis 2,380) im Serum, sowie 0,1297 (95% CI 0,02535 bis 0,2341) und 0,7424 (95% CI -0,006530 bis 1,491) im Liquor gemessen. Auch in dieser Gruppe, war die gemessene  $OD_{450nm}$  für IgG<sub>2</sub> und IgG<sub>4</sub> mit 0,05273 (95% CI 0,02774 bis 0,07772) und 0,05127 (95% CI 0,02229 bis 0,08025) im Serum und 0,03755 (95% CI 0,02145 bis 0,05364) bzw. 0,03918 (95% CI 0,02596 bis 0,05241) im Liquor deutlich geringer.

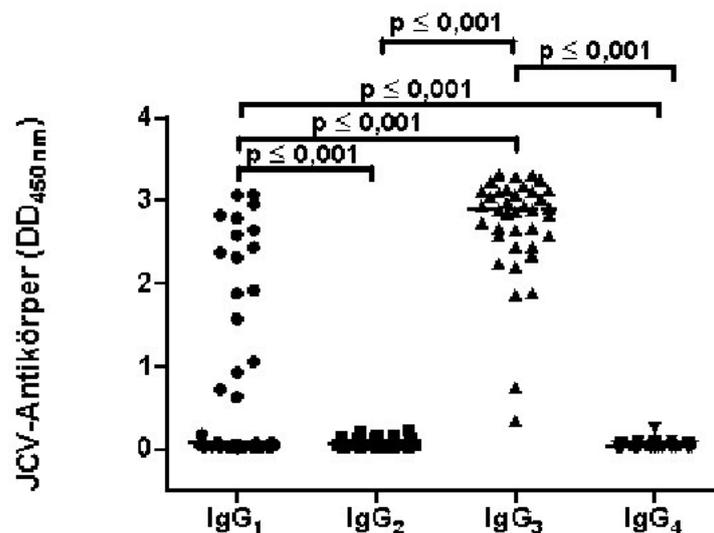


Abb. 3.6: Vergleich der Antikörperaktivität der IgG-Subklassen in der Gruppe „PML mit Natalizumab“ im Serum ( $n = 38$ ). Graphischer Vergleich von IgG<sub>1</sub> und IgG<sub>3</sub> mit den anderen Subklassen, wobei sich in allen Fällen  $p \leq 0,001$  ergab.

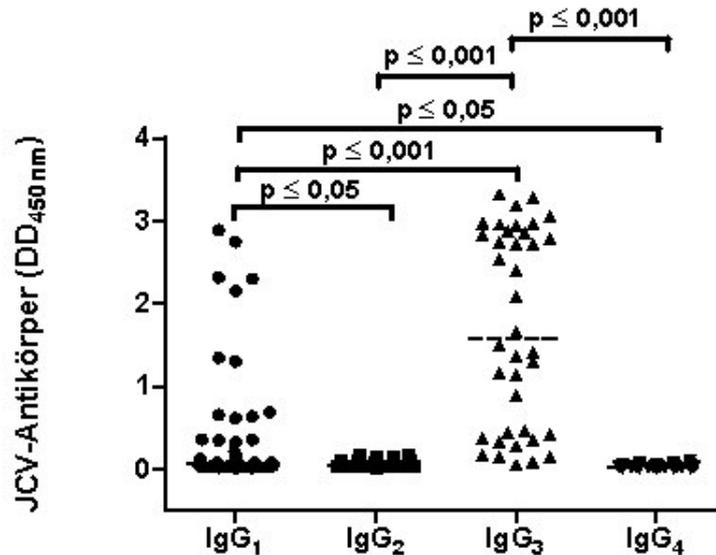


Abb. 3.7: Vergleich der Antikörperaktivität der IgG-Subklassen in der Gruppe „PML mit Natalizumab“ im Liquor (n = 38). Graphischer Vergleich von IgG<sub>1</sub> und IgG<sub>3</sub> mit den anderen Subklassen.  $p \leq 0,05$  bezieht sich auf den Vergleich von IgG<sub>1</sub> mit IgG<sub>2</sub> und IgG<sub>4</sub>,  $p \leq 0,001$  bezieht sich auf die Vergleiche von IgG<sub>1</sub> mit IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>2</sub> mit IgG<sub>3</sub> und IgG<sub>3</sub> mit IgG<sub>4</sub>.

### 3.1.5 Anti-JCV- und Anti-BKV-IgM

Aus allen Proben wurden mittels IgM-ELISA die OD<sub>450nm</sub> zum Vergleich der enthaltenen IgM-Konzentrationen gemessen, da eine direkte Bestimmung der Konzentration mangels definierter Standards nicht möglich war (siehe Tabellen 3.5 und 3.6). Die beiden Patientengruppen mit PML wurden weiterhin aufgeteilt in „D“ („Messzeitpunkt 1“), „DX1“ („Messzeitpunkt 2“) und „DX2“ („Messzeitpunkt 3“). Die Abstände der Messzeitpunkte waren nicht fest definiert, es handelt sich um im Verlauf der PML-Erkrankung gewonnenes Material. Dabei bezeichnet „D“ Proben, welche zu Beginn oder bei Diagnosestellung gewonnen wurde. Die Proben der Subgruppen „DX1“ und „DX2“ wurden zu späteren Zeitpunkten gewonnen, hierbei lagen Proben der Subgruppe „DX1“ zeitlich vor Proben der Subgruppe „DX2“.

In den Untersuchungen der Serum- und Liquorproben konnten für anti-JCV-IgM keine Unterschiede festgestellt werden ( $p > 0,05$ , vgl. Abb. 3.9).

Im Vergleich der gemessenen anti-BKV-IgM-Mengen unterschieden sich nur die „PML ohne Natalizumab“ Gruppen „D“ und „DX“ von der Gruppe mit erhöhtem MRZ im Serum ( $p > 0,05$ , siehe Abb. 3.10). Hier zeigten die gemessenen OD<sub>450nm</sub> deutlich höhere Mengen IgM in der Gruppe der Patienten mit erhöhtem MRZ als in der Gruppe der PML-Patienten ohne Natalizumab. Zwischen den anderen Gruppen konnten keine Unterschiede festgestellt werden ( $p > 0,05$ ).

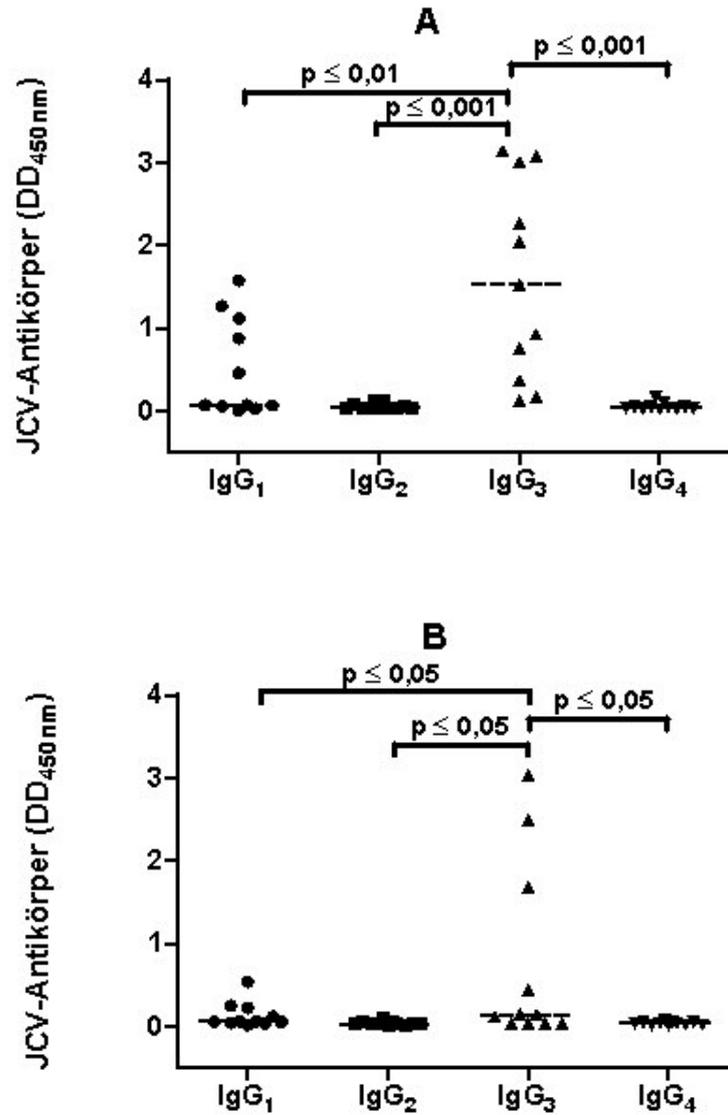


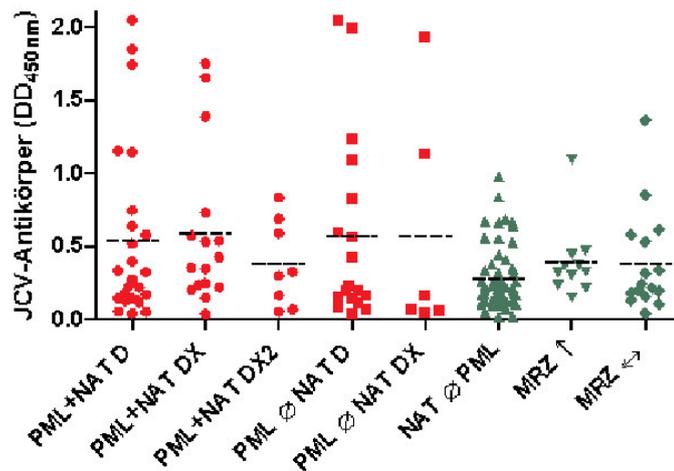
Abb. 3.8: Vergleich der Antikörperaktivität der IgG-Subklassen in der Gruppe „PML ohne Natalizumab“ (n = 11). A) Vergleich von IgG<sub>3</sub> mit den anderen Subklassen im Serum.  $p \leq 0,01$  bezieht sich auf den Vergleich von IgG<sub>3</sub> mit IgG<sub>1</sub>.  $p \leq 0,001$  bezieht sich auf die Vergleiche von IgG<sub>3</sub> mit den Subklassen IgG<sub>2</sub> und IgG<sub>4</sub> B) Vergleich von IgG<sub>3</sub> mit den anderen Subklassen im Liquor. Hier ergab sich jeweils  $p \leq 0,05$ .

Gruppe	n	Serum		Liquor	
		Mittelwert	95% CI	Mittelwert	95% CI
PML+NAT D	25	0,5335	0,2886 bis 0,7784	0,0870	-0,0141 bis 0,1881
PML+NAT DX1	16	0,5857	0,2995 bis 0,8718	0,0583	-0,0052 bis 0,1219
PML+NAT DX2	8	0,3758	0,1300 bis 0,6215	0,1145	-0,0516 bis 0,2806
PML Ø NAT D	18	0,5645	0,2467 bis 0,8823	0,1394	-0,0435 bis 0,3224
PML Ø NAT DX1	6	0,5663	-0,2616 bis 1,3940	0,2288	-0,1757 bis 0,6333
NAT Ø PML	56	0,2777	0,2202 bis 0,3352	0,0170	0,0131 bis 0,0210
MRZ erhöht	11	0,3893	0,2200 bis 0,5586	0,0124	0,0108 bis 0,0140
MRZ normal	16	0,3774	0,1943 bis 0,5606	0,0134	0,0056 bis 0,0213

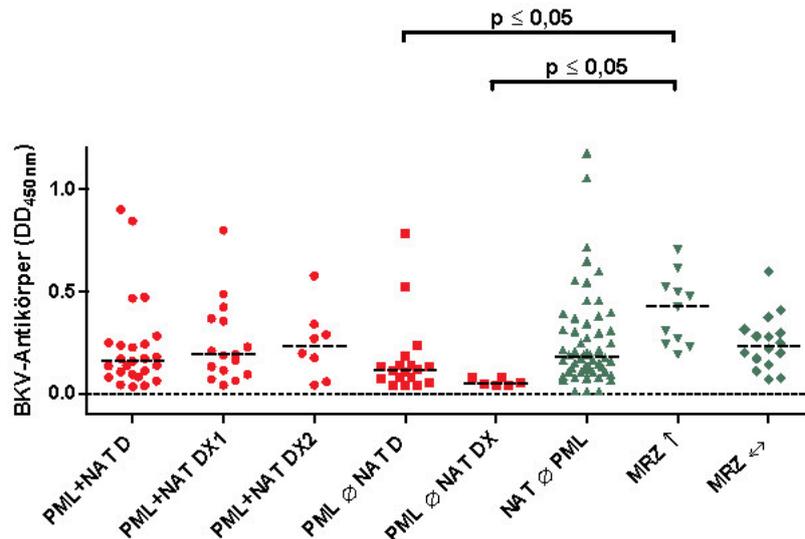
**Tabelle 3.5: Mittelwerte und 95% Konfidenzintervalle der gemessenen Anti-JCV-IgM-Antikörpermengen im Serum und im Liquor.** Aufgeführt sind alle Vergleichsgruppen, wobei die Gruppen „PML mit Natalizumab“ und „PML ohne Natalizumab“ unterteilt wurden in „D“ („Messzeitpunkt 1“), „DX1“ („Messzeitpunkt 2“) und die „PML mit Natalizumab“ Gruppe außerdem noch in „DX2“ („Messzeitpunkt 3“). „D“ bezeichnet die zu Beginn bzw. bei Diagnosestellung gewonnenen Proben. „DX1“ und „DX2“ bezeichnen Verlaufspalten.

Gruppe	n	Serum		Liquor	
		Mittelwert	95% CI	Mittelwert	95% CI
PML+NAT D	25	0,2273	0,1343 bis 0,3203	0,0145	0,0101 bis 0,0189
PML+NAT DX1	16	0,2458	0,1395 bis 0,3522	0,0281	-0,0074 bis 0,0636
PML+NAT DX2	8	0,2439	0,1009 bis 0,3869	0,0150	0,0066 bis 0,0234
PML Ø NAT D	18	0,1676	0,0736 bis 0,2615	0,0129	0,0103 bis 0,0154
PML Ø NAT DX1	6	0,0568	0,0360 bis 0,0777	0,0113	0,0058 bis 0,0168
NAT Ø PML	56	0,2592	0,1966 bis 0,3218	0,0140	0,0082 bis 0,0199
MRZ erhöht	11	0,4080	0,2934 bis 0,5226	0,0105	0,0077 bis 0,0133
MRZ normal	16	0,2498	0,1775 bis 0,3220	0,0109	0,0080 bis 0,0138

**Tabelle 3.6: Mittelwert und 95% Konfidenzintervalle der gemessenen Anti-BKV-IgM-Antikörpermengen in Serum und Liquor.** Aufgeführt sind alle Vergleichsgruppen, wobei die Gruppen „PML mit Natalizumab“ und „PML ohne Natalizumab“ unterteilt wurden in „D“ („Messzeitpunkt 1“), „DX1“ („Messzeitpunkt 2“) und die „PML mit Natalizumab“ Gruppe außerdem noch in „DX2“ („Messzeitpunkt 3“). „D“ bezeichnet die zu Beginn bzw. bei Diagnosestellung gewonnenen Proben. „DX1“ und „DX2“ bezeichnen Verlaufspalten.



**Abb. 3.9: Vergleich der Antikörperaktivität von Anti-JCV-IgM im Serum.** Vergleich der fünf untersuchten Gruppen, von den Gruppen mit PML-Patienten (PML+NAT und PML Ø NAT, rote Punkte) wurden Verlaufsmessungen durchgeführt („D“, „DX1“ und „DX2“ bzw. „D“ und „DX“). Von den Gruppen ohne PML-Patienten („NAT Ø PML“, „MRZ erhöht“ und „MRZ normal“, grüne Punkte) wurden Einzelmessungen durchgeführt.



**Abb. 3.10: Vergleich der Antikörperaktivität von Anti-BKV-IgM im Serum.** Vergleich der fünf untersuchten Gruppen, von den Gruppen mit PML-Patienten (PML+NAT und PML Ø NAT, rote Punkte) wurden Verlaufsmessungen durchgeführt („D“, „DX1“ und „DX2“ bzw. „D“ und „DX“). Von den Gruppen ohne PML-Patienten („NAT Ø PML“, „MRZ erhöht“ und „MRZ normal“, grüne Punkte) wurden Einzelmessungen durchgeführt.

### 3.1.6 Anti-JCV-IgG Affinität

In den Untersuchungen der Affinität der anti-JCV-IgG Antikörper im Serum der fünf untersuchten Gruppen konnten keine Unterschiede zwischen den jeweiligen Kollektiven festgestellt werden ( $p > 0,05$ , siehe Abb. 3.11). In der Gruppe „PML mit Natalizumab“ ( $n = 43$ ) besaßen im Mittel 90,67% (95% CI 83,19 bis 98,16%) der Antikörper eine so große Affinität, dass sie mit der verwendeten Methode nicht vom primären Antigen gelöst werden konnten. In der Gruppe „PML ohne Natalizumab“ ( $n = 27$ ) waren es 83,28% (95% CI 71,16 bis 95,39%), in der Gruppe „Natalizumab ohne PML“ ( $n = 40$ ) 76,02% (95% CI 66,94 bis 85,10%), in der Gruppe „MRZ erhöht“ ( $n = 6$ ) 86,28% (95% CI 70,87 bis 101,7%) und in der Gruppe „MRZ normal“ ( $n = 12$ ) 83,68% (95% CI 72,53 bis 94,82%).

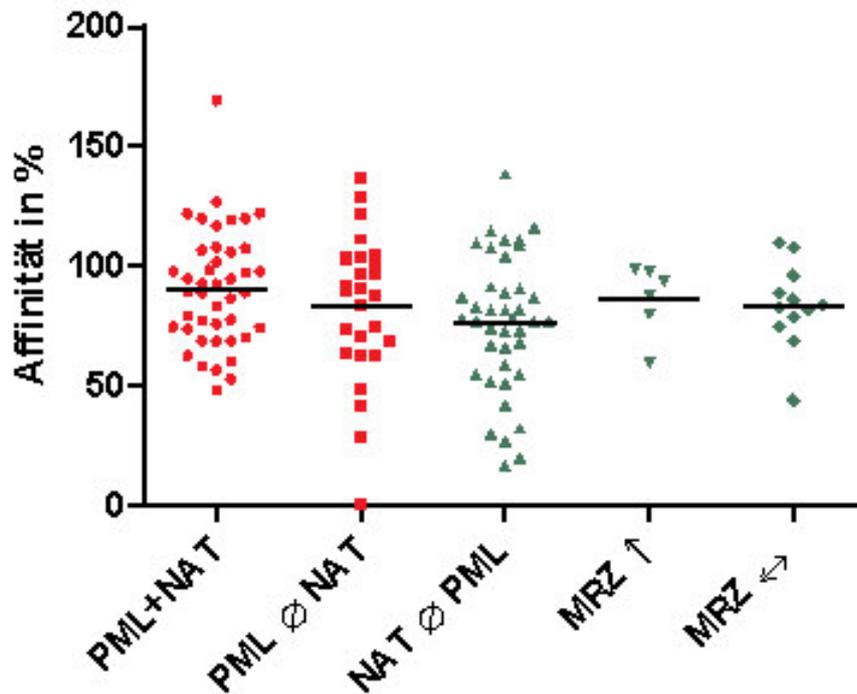


Abb. 3.11: Affinität der JCV-Antikörper (relative Bindung der Antikörper vor/nach Konkurrenz mit freiem Antigen in %) Die beiden Gruppen mit PML-Patienten sind in Rot dargestellt, die drei Gruppen ohne PML-Patienten sind in Grün dargestellt. Es konnten im Vergleich der Gruppen keine Unterschiede festgestellt werden.

## 3.2 PCR-Ergebnisse

### 3.2.1 Ergebnisse der Vergleichsgruppen

Zur Feststellung der in den Proben enthaltenen Viruslast wurden alle Seren und Liquores per Realtime-PCR untersucht (siehe Tabelle 3.7 und Tabelle 3.8). Nur in den Gruppen „PML mit Natalizumab“, „PML ohne Natalizumab“ und „Natalizumab ohne PML“ konnten Viruskopien gefunden werden. Die Gruppen „MRZ erhöht“ (n=18) und „MRZ normal“ (n=22) enthielten keine nachweisbaren Mengen an JCV- oder BKV-DNA. In der Gruppe „PML mit Natalizumab“ (n=26) fanden sich im Mittel 423,3 JCV-Kopien/ml (K/ml) im Serum (95% CI –58,74 bis 905,3 K/ml) und 38 088 JCV-Kopien/ml im Liquor (95% CI –36 240 bis 1 124 160 K/ml), sowie 5,192 BKV-Kopien/ml im Serum (95% CI –4,862 bis 15,25 K/ml). Im Liquor fanden sich keine BKV-DNA-Kopien.

Die Proben aus der „PML ohne Natalizumab“ Gruppe (n=16) enthielten im Mittel 17 333 JCV-Kopien (95% CI –7938 bis 42 603 K/ml) im Serum und 4657 JCV-Kopien/ml im Liquor (95% CI 246,6 bis 9068 K/ml). BKV-DNA konnte nicht nachgewiesen werden. In der Gruppe „Natalizumab ohne PML“ (n=44) wurden nur geringe Mengen JCV-DNA im Serum gefunden (im Mittel 0,2273 Kopien/ml, 95% CI –0,2313 bis 0,6859 K/ml). In den anderen Materialien wurden keine weiteren Viruskopien gefunden.

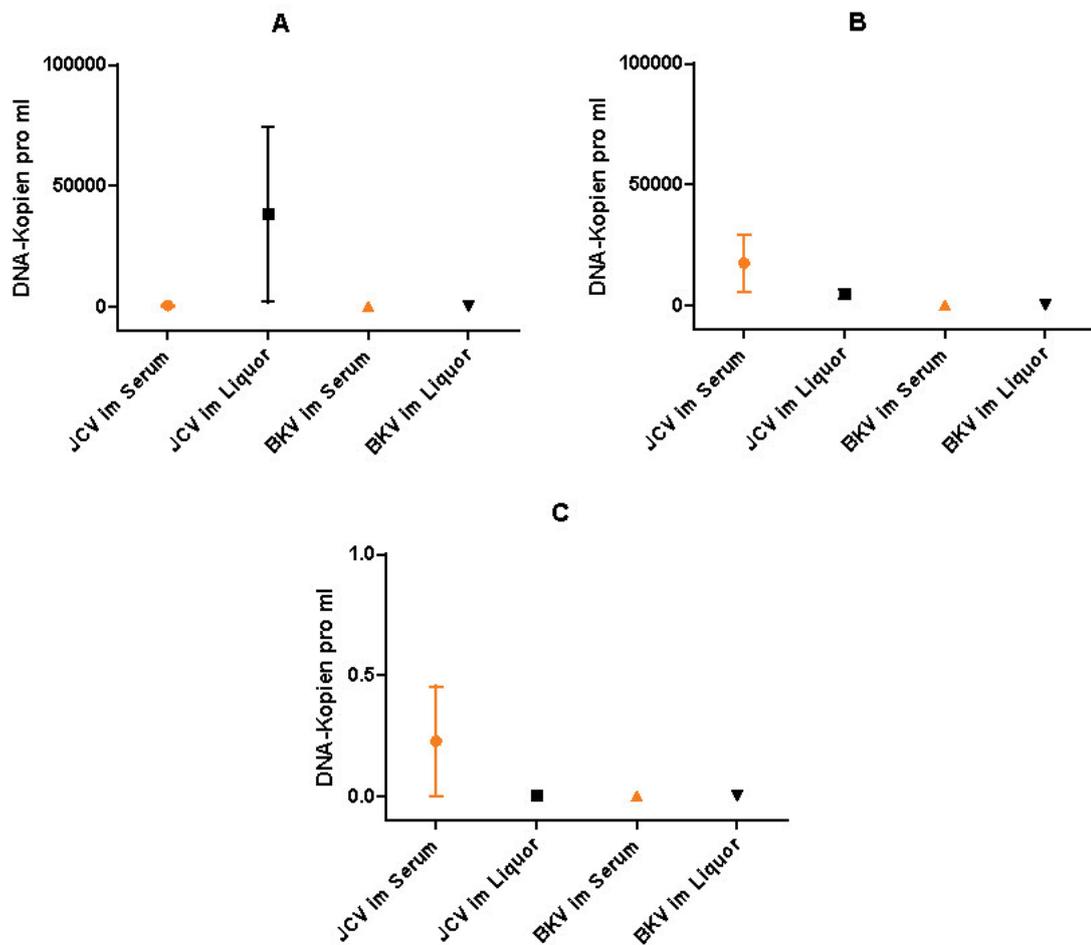
Innerhalb der Gruppen waren keine signifikanten Unterschiede feststellbar ( $p > 0,05$ , vgl. Abb. 3.12).

Gruppen	JCV-DNA im Serum pos.	JCV-DNA im Serum neg.	JCV-DNA im Liquor pos.	JCV-DNA im Liquor negativ	n <sub>gesamt</sub>
„PML unter Nat.“	14 (53,8%)	12 (46,2%)	22 (84,6%)	4 (15,4%)	26
„PML ohne Nat.“	9 (56,3%)	7 (43,7%)	15 (93,8%)	1 (6,2%)	16
„Nat. ohne PML“	1 (2,3%)	43 (97,7%)	0 (0%)	44 (100%)	44

**Tabelle 3.7: Ergebnisse der JCV-DNA-PCR in den Vergleichsgruppen.**

Gruppen	BKV-DNA im Serum pos.	BKV-DNA im Serum neg.	BKV-DNA im Liquor pos.	BKV-DNA im Liquor negativ	n <sub>gesamt</sub>
„PML unter Nat.“	2 (7,7%)	24 (92,3%)	0 (0%)	26 (100%)	26
„PML ohne Nat.“	0 (0%)	16 (100%)	0 (0%)	16 (100%)	16
„Nat. ohne PML“	0 (0%)	44 (100%)	0 (0%)	44 (100%)	44

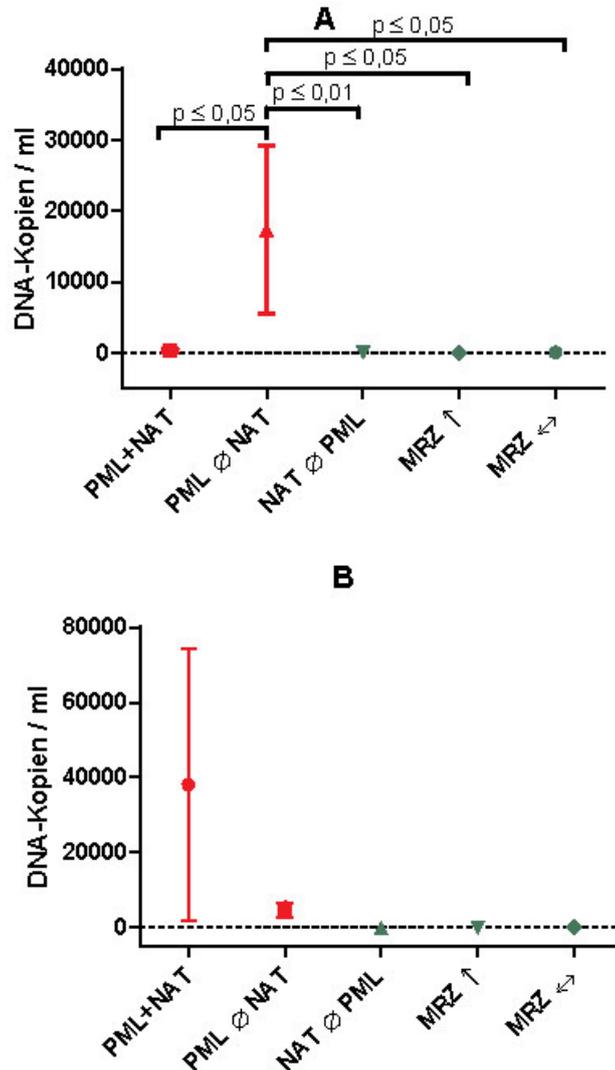
**Tabelle 3.8: Ergebnisse der BKV-DNA-PCR in den Vergleichsgruppen.**



**Abb. 3.12: Quantitative Bestimmung der JCV- und BKV-DNA-Kopien in Serum (orange Punkte) und Liquor (schwarze Punkte).** Dargestellt sind in A) die PCR-Ergebnisse für die Gruppe „PML mit Natalizumab“ (n=26), in B) für die Gruppe „PML ohne Natalizumab“ (n=16) und in C) für die Gruppe „Natalizumab ohne PML“ (n=44).

### 3.2.2 JCV-DNA

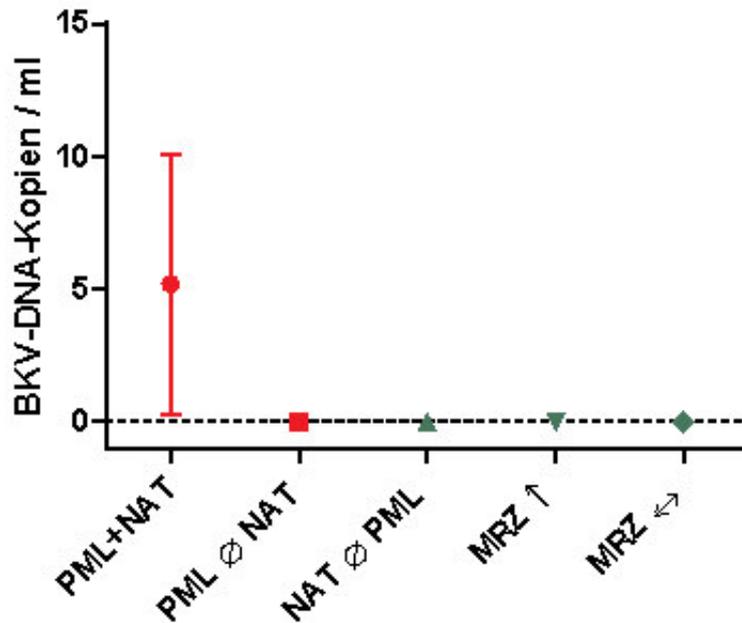
Im direkten Vergleich der nachgewiesenen JCV-Viruskopien in Serum und Liquor in den fünf verglichenen Gruppen zeigte sich in den Seren der Gruppe „PML ohne Natalizumab“ eine deutlich größere Viruslast als in den anderen vier Gruppen ( $p \leq 0,05$ , bzw.  $p \leq 0,01$  im Vergleich der Gruppe „PML ohne Natalizumab“ mit der Gruppe „Natalizumab ohne PML“, siehe Abb. 3.13). Die anderen Gruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander, obwohl nur in einem Serum eines Patienten ohne PML Virus-DNA gefunden werden konnte. Auch konnte in den Liquorproben kein Unterschied in den verglichenen Gruppen festgestellt werden ( $p > 0,05$ ). Es wurden jedoch ausschließlich in den PML-Gruppen Viruskopien gefunden.



**Abb. 3.13: Vergleich der Mittelwerte und SEM der nachgewiesenen JCV-Viruskopien.** A) Vergleich der JCV-DNA Kopien im Serum.  $p \leq 0,05$  bezieht sich auf den Vergleich der Gruppe „PML ohne Natalizumab“ mit den Gruppen „PML mit Natalizumab“, „MRZ erhöht“ und „MRZ normal“.  $p \leq 0,01$  bezieht sich auf den Vergleich der Gruppe „PML ohne Natalizumab“ mit der Gruppe „Natalizumab ohne PML“. B) Vergleich der nachgewiesenen JCV-DNA Kopien im Liquor. Es konnten hier keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden ( $p > 0,05$ ).

### 3.2.3 BKV-DNA

In den parallel durchgeführten qPCR-Untersuchungen auf BKV konnten nur in den Serumproben von zwei Patienten, die unter Natalizumab eine PML entwickelt hatten, BKV-Kopien nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.14). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bestand dabei nicht. In den Liquorproben konnten keine BKV-Kopien nachgewiesen werden.



**Abb. 3.14: Vergleich der Mittelwerte und SEM der nachgewiesenen BKV-Viruskopien.** Vergleich der nachgewiesenen BKV-DNA-Kopien im Serum. Es fanden sich nur in zwei Serumproben in der „PML mit Natalizumab“-Gruppe BKV-DNA-Kopien. Die Gruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander. In den Liquorproben wurden keine BKV-DNA-Kopien nachgewiesen.

## 4 Diskussion

Das JC-Virus stellt für MS-Patienten, welche mit Natalizumab behandelt werden, eine ernstzunehmende Bedrohung dar. Die hohe Durchseuchungsrate in Verbindung mit der zu erwartenden steigenden Zahl an Patienten, die mit Natalizumab behandelt werden, machen es notwendig, mögliche Komplikationen der Behandlung im Sinne einer PML schnellstmöglich zu diagnostizieren, um schwerwiegenden Folgeschäden für den jeweiligen Patienten zu vermeiden.

Ziel dieser Arbeit war es daher unter anderem herauszufinden, ob die Messung des JCV-Liquor/Serum-Antikörperindex für eine Diagnosestellung angewendet werden kann.

### 4.1 JCV-IgG

In den Ergebnissen dieser Arbeit zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Serum und Liquor in der Anti-JCV-IgG-Konzentration zwischen der PML-Gruppe unter Natalizumab und der PML-Gruppe ohne Natalizumab. Dies erscheint insofern überraschend, als dass in beiden Gruppen höchst unterschiedliche Mechanismen der Krankheitsentstehung zugrunde zu legen sind. Bei den Patienten, welche unter Natalizumab eine PML entwickelten, ist davon auszugehen, dass diese über ein im Sinne der Infektabwehr relativ normal funktionierendes Immunsystem verfügen, welches durch die Wirkung des Natalizumab gestört wird. Daher ist beim Auftreten einer PML mit einer im Vergleich zur latenten JCV-Infektion gesteigerten IgG-Produktion im Serum zu rechnen, so wie es in den durchgeführten Untersuchungen nachgewiesen wurde. Bei den untersuchten Patienten, welche ohne Natalizumab eine PML entwickelt hatten, handelte es sich um eine heterogene Gruppe, in der die Patienten teilweise schwerwiegende Störungen in der Funktion ihres Immunsystems und damit aller Immunreaktionen aufwiesen – sei es bedingt durch Malignome oder immunsuppressive Erkrankungen. In dieser Gruppe hätte man daher eine inadäquate Immunantwort auf die aktive JC-Virus Infektion erwarten können. Tendenziell lässt sich zwar in dieser Gruppe ein niedrigerer JCV-IgG-Mittelwert im Vergleich zur „PML + NAT“-Gruppe feststellen, es können jedoch keine signifikanten Unterschiede berechnet werden. Hier stellt sich also die Frage, ob weiterführende Untersuchungen mit einem größeren Patientenkollektiv zu den gleichen Ergebnissen kommen.

Dass im Liquor keine Unterschiede in den gemessenen Antikörperaktivitäten zwischen den beiden Gruppen mit PML-Patienten festgestellt werden konnten, ließe sich aus der Funktion des Natalizumab erklären. Das Medikament verhindert die Invasion von Leukozyten in das ZNS und führt daher zu einer lokalen Immunschwäche und damit zu ähnlichen Gegebenheiten wie in der PML-Patientengruppe ohne Natalizumab. Dass die gemessenen IgG-Konzentrationen der Kontrollgruppen ohne PML alle niedriger ausfielen als die der beiden PML-Gruppen, resultiert aus der fehlenden Aktivität des Virus und der daraus fehlenden Stimulation des Immunsystems. Insgesamt konnten im Liquor nur in 17% aller Proben von nicht PML-Patienten IgG gefunden werden. Bei diesen Patienten handelte es sich zum Teil um MS-Patienten oder um Patienten mit schweren anderen Erkrankungen des Gehirns wie Enzephalitis oder M. Parkinson. Grundsätzlich wäre hier daher auch eine Einschränkung der Schrankenfunktion des ZNS zu diskutieren.

Das Virus persistiert in großen Teilen der Bevölkerung, wie bereits durch verschiedenste Studien gezeigt werden konnte, und verursacht in der Regel nur eine latente Infektion ohne Krankheitswert und ohne Schädigung des Wirtsorganismus.<sup>46,62</sup>

Die fehlende Aktivität führt daher auch zu einem nur niedrigen Vorhandensein der gegen das Virus gerichteten Antikörper. Hier lässt sich festhalten, dass der prozentuale Anteil der Patienten ohne PML,

bei denen JCV-IgG im Serum nachweisbar waren, mit 73% in einem Bereich lag, den auch andere Studien bereits gezeigt haben und den z.B. Warnke et.al. 2013 beschrieben haben.<sup>88</sup>

## 4.2 BKV-IgG

Die von uns aufgeworfene Vermutung, die Infektion mit JCV könnte einen Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit einer gleichzeitigen BKV-Infektion haben bzw. diese durch kreuzprotektive Antikörper ggf. verringern, konnte in unseren Untersuchungen nicht klar nachgewiesen werden. Die gemessene BKV-IgG-Aktivität im Serum war in den fünf Gruppen nicht signifikant unterschiedlich. Es lassen sich jedoch möglicherweise Tendenzen in den Mittelwerten der einzelnen Gruppen erkennen, wobei diese bei den Patientengruppen ohne PML eher höher lagen als in den beiden Gruppen mit PML. Hierzu könnten weiterführende Untersuchungen mit einer höheren Anzahl untersuchter Proben sinnvoll sein.

Es zeigte sich jedoch ein signifikanter Unterschied in der Prävalenz innerhalb der Gruppen selbst. Die in unseren Patientengruppen ohne PML gemessene relative Häufigkeit eines Auftretens von anti-BKV-IgG entspricht mit 85% den Angaben aus der Literatur. Demgegenüber waren nur bei 48% der PML-Patienten anti-BKV-IgG nachweisbar. Fishers Exact Test ergab hierbei ein  $p \leq 0,001$ , bei einer Odds Ratio von 0,1515. Diese Daten könnte man in dem Sinn interpretieren, dass Natalizumab-Patienten von einer vorangegangenen BKV-Infektion insofern profitieren, dass sie immunologisch einen breiteren Schutz gegen Polyomaviren entwickelt haben, der sie möglicherweise vor der Manifestation ihrer JCV-Infektion als PML besser schützt. Umgekehrt kann man diagnostisch daraus ableiten, dass JCV-seropositive/BKV-seronegative Patienten ein erhöhtes Risiko haben, an einer PML zu erkranken. Es wäre in weiteren, größeren Studien zu klären, ob die routinemäßige Bestimmung des BKV-Serostatus als ein Baustein zur Risikostratifizierung bei Natalizumab-Patienten sinnvoll sein könnte.

Ohne signifikante Unterschiede blieben die BKV-IgG-Untersuchungen der Liquores der Patienten. Hier konnten nur sehr wenige bzw. gar keine Antikörper nachgewiesen werden. Dies erscheint insofern wenig überraschend, als dass eine Produktion von anti-BKV-IgG im ZNS ein gehäuftes Vorkommen von BKV-Virus in selbigem voraussetzen würde. Da die Aktivität von BKV jedoch vorrangig in den Zellen der Niere liegt, lassen sich die im ZNS gefundenen anti-BKV-IgG als durch Diffusion aus dem Blut übergetreten interpretieren. Eine weitere Interpretation ist auch, dass die nachgewiesenen Liquor BKV-Antikörper kreuzreaktive JCV-Antikörper sind. Es konnte in anderen Untersuchungen der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die serologische Testung von JCV- und BKV-Antikörpern insbesondere bei Langzeitverläufen einzelner Patienten mit PML Hinweise auf Kreuzreaktionen vom JCV hin zum BKV aufweisen.

Ein signifikanter Anstieg des IgG-Spiegels kann als Zeichen der Aktivität des Virus gewertet werden und war somit in unserem Kollektiv nicht zu erwarten, da anderenfalls im Serum mit dem Auftreten von BKV-DNA zu rechnen gewesen wäre. Diese konnte von uns jedoch in den untersuchten Proben nur bei Patienten mit PML unter Natalizumab gefunden werden.

### 4.3 Liquor/Serum-Quotient

Hinsichtlich der Fragestellung, ob sich die Bestimmung des Liquor/Serum-Quotienten zur Diagnostik einer PML eignet, konnte festgestellt werden, dass in den beiden PML-Gruppen im Mittel deutlich über dem Niveau der Kontrollgruppen liegende Quotienten messbar waren. Grundsätzlich könnte ein hoher IgG-Titer im Liquor durch die Produktion des Immunglobulins im ZNS oder den Übertritt von selbigem vom Serum in den Liquor begründet sein. Um zwischen diesen Möglichkeiten zu unterscheiden, wurde der Quotient zwischen den IgG-Titern des Liquors und des Serums unter Berücksichtigung der Serum/Liquor IgG/Albumin-Werte (Reiber-Index) berechnet, wobei ein Wert  $>1,5$  als Beweis der intrathekalen Produktion gewertet wurde. Die Mittelwerte der beiden Gruppen mit PML-Patienten lagen dabei jeweils über 2. Es ist folglich von einer eigenständigen Produktion von gegen JCV gerichtetem IgG im ZNS auszugehen.

In der Publikation von Warnke et al. 2014, in welche die hier erhobenen Daten zusammen mit Ergebnissen aus weiteren Laboren eingeflossen sind, konnte gezeigt werden, dass mit dem  $AI_{JCV}$  ein spezifischer Test zur Verfügung steht, der als zusätzliches Werkzeug die Diagnostik einer PML bei Patienten unter Natalizumabtherapie unterstützen kann.<sup>89</sup>

## 4.4 JCV-IgG-Subklassen

Durch uns erfolgte eine Bestimmung der Anteile der vier IgG-Subklassen an der IgG-Gesamtmenge mittels ELISA. Hierbei zeigte sich ein Überwiegen der Subklassen 1 und 3, wobei Subklasse 3 die am häufigsten auftretende war.

Die von uns gefundene Dominanz der IgG-Subklassen 1 und 3 in den beiden Gruppen mit PML sind vereinbar mit Ergebnissen, die andere Studien mit verschiedenen anderen Viren erzielt haben. So zeigten Ferrante et al. 1990, dass es bei viralen Infekten zu einer Produktion von IgG<sub>1</sub> und IgG<sub>3</sub> kommt, welche damit wichtiger Bestandteil der B-Zell-vermittelten Abwehr sind.<sup>30</sup> Als eine durch das JC-Virus ausgelöste Erkrankung war bei einer PML daher mit dem Auftreten dieser Antikörpersubtypen zu rechnen.

Collins et al. zeigten 2013, dass IgG<sub>3</sub> FcγR vermittelte Reaktionen der frühen Infektabwehr beeinflusst.<sup>24</sup> IgG<sub>3</sub> wirkt vor allem komplementaktivierend.<sup>24</sup> IgG<sub>1</sub> gehört zu den hochaffinen IgG-Subklassen, es wird erst später im Verlauf einer Infektion gebildet und stellt den Hauptanteil der Subklassen in der Immunantwort dar.<sup>24</sup>

Es kann also gemutmaßt werden, dass es erst im späteren Verlauf der PML-Erkrankung zu einem Überwiegen der IgG-Subklasse 1 gekommen wäre. Hier müssten weitere Untersuchungen im Verlauf zeigen, ob es zu dieser Umstellung kommt. Andererseits wäre aber auch denkbar, dass das Fehlen dieser Änderung für die Entstehung der PML mit verantwortlich ist. Dann nämlich würden die weniger affinen IgG<sub>3</sub> überwiegen und die Immunantwort trüge Zeichen einer nicht ausreichenden Reifung.

## 4.5 JCV-IgM

Das Immunsystem reagiert auf eine virale Infektion zunächst mit der Bildung des relativ unspezifischen IgM. Erst nach einiger Zeit kommt es zu einer Umstellung auf erregerspezifische IgG. Bei vielen Erkrankungen lassen sich daher Aussagen über das Alter der Infektion auf Grund der Art und Menge der gefundenen Immunglobuline treffen. So wird das Vorhandensein von IgM bei Infektionen mit dem Hepatitis B Virus als Zeichen einer aktiven Hepatitisinfektion gewertet. Im Gegensatz zu IgG, welches auch nach einer durchgemachten Infektion nachweisbar bleibt, ist IgM daher vor allem während der akuten Infektion nachweisbar und verschwindet nach einiger Zeit wieder aus dem Blut. Bei einer Reaktivierung des JC-Virus im Rahmen einer PML kann es jedoch auch wieder zu einer Bildung von IgM kommen.

Da unseres Wissens nach noch keine Untersuchungen zu diesem Thema bei PML-Patienten durchgeführt wurden, hofften wir, den IgM-Titer im Verlauf einer PML nachvollziehen zu können. Das Vorhandensein von Verlaufspuren einiger Patienten, welche in unregelmäßigen Abständen bei klinischen Verlaufskontrollen gewonnen wurden, ermöglichte es uns Untersuchungen hierzu anzustellen. Als problematisch erwies sich die Tatsache, dass eine Berechnung der Antikörpermenge auf Grund fehlender, standardisierter Proben nicht möglich war. Es wurde stattdessen die Differenz des absorbierten Lichtes bei 450nm zwischen Kontrollen und Proben bestimmt. Die gemessenen Werte lassen Rückschlüsse auf die enthaltene IgM-Menge zu und ermöglichen die Beurteilung des Titers im Verlauf.

In den von uns erhobenen Daten konnten im Liquor keine Unterschiede in den IgM-Titern der Proben von PML-Patienten zu den Proben der Kontrollgruppen festgestellt werden. Die Ergebnisse im Serum waren nicht signifikant unterschiedlich, mit Ausnahme des Vergleichs der Patientenproben von Personen mit PML, aber ohne Natalizumab (PML Ø NAT). Hier zeigten sich Unterschiede zur Kontrollgruppe mit Personen mit erhöhtem MRZ. Insgesamt kann jedoch gesagt werden, dass die gemessenen Antikörpertiter über alle Gruppen hinweg als niedrig einzuschätzen waren. Es scheint demzufolge keine relevante Neubildung von IgM bei einer PML zu geben. Dies lässt sich möglicherweise darauf zurückführen, dass es sich bei der PML nicht um die Erstinfektion mit dem JC-Virus handelt, sondern um die Reaktivierung einer Infektion, welche häufig bereits in der Jugend und ohne nennenswerte Symptome vonstattengeht. Zu diesem Zeitpunkt ist ein IgM-Titer deutlich über den von uns gemessenen Werten zu erwarten. Weiterhin ist festzuhalten, dass sich die Bestimmung von anti-JCV-IgM nicht zur Diagnostik einer PML eignet, da auch in Patienten ohne aktive JCV-Infektion IgM nachgewiesen werden konnte. Dies steht im Einklang mit Untersuchungen, die Knowles et al. 1999 an HIV positiven Patienten durchgeführt haben.<sup>45</sup> In diesen Untersuchungen konnte kein Zusammenhang zwischen der Produktion von IgM und der Ausscheidung von JCV-DNA im Urin gefunden werden. Bereits 1995 hatten Knowles et al. Untersuchungen zum Auftreten von anti-JCV-Antikörpern bei PML-Patienten angestellt und nur in 55% der untersuchten Seren IgM gefunden.<sup>44</sup> Gleichzeitig fanden sich in beiden Untersuchungen auch in den Kontrollgruppen ohne PML IgM gegen JCV.

Die klinische Messung von JCV-IgM erscheint unter diesen Gesichtspunkten nicht zielführend.

## 4.6 BKV-IgM

Im Gegensatz zu den zuvor genannten Ergebnissen zur Diagnostik einer PML mit Hilfe von IgM zeigten Randhawa et al. 2006, dass ein gehäuftes Auftreten von anti-BKV-IgM mit einer gesteigerten Aktivität des BK-Virus vergesellschaftet ist.<sup>73</sup>

Es erscheint daher wenig überraschend, dass sich die in unseren Untersuchungen gemessenen IgM-Mengen in einem sehr niedrigen Bereich bewegten.

Zwischen den von uns untersuchten Patientenkollektiven konnten zudem praktisch keine Unterschiede in der Häufigkeit des Auftretens der Antikörper festgestellt werden. Einzig die Gruppe der Patienten mit erhöhtem MRZ wies einzelne signifikante Unterschiede zu anderen Kontrollgruppen auf. Hier ist aber festzuhalten, dass diese Gruppe mit 11 Patienten relativ klein war und sich keine BKV-DNA Kopien im Material dieser Patienten fanden. Eine erweiterte Untersuchung eines größeren Kollektivs an Patienten mit erhöhtem MRZ könnte daher klären, inwieweit diese Ergebnisse valide sind.

## 4.7 Anti-JCV IgG Affinität

Bei einem Risiko von etwa 4:1000 unter einer Natalizumabtherapie eine PML zu entwickeln, stellt sich die Frage, warum es bei den betroffenen Patienten zu eben jener fatalen Reaktivierung des JC-Virus kommt und bei anderen Patienten nicht. Um sich diesem komplexen Themengebiet zu nähern, wurde die Frage aufgestellt, ob die B-Zellen der betroffenen Patienten möglicherweise niedriger affine anti-JCV-IgG produzieren als vom Immunsystem von Patienten der Kontrollgruppen.

Zur Klärung dieser Frage wurde die Affinität der in den Patientenproben gefundenen IgG-Antikörper im zuvor beschriebenen Versuchsaufbau untersucht. Hierbei ließen sich jedoch keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen nachweisen. In allen Patientenproben waren die gefundenen Antikörper als hochaffin einzustufen. In der Patientengruppe, welche unter Natalizumab eine PML entwickelt hatte, sind sogar eher Tendenzen zu einer höheren Affinität der IgG als in den anderen Gruppen zu beobachten. Ausgehend davon, dass diese Patienten wie beschrieben an sich über ein adäquates Immunsystem verfügen, welches durch den Wirkstoff in seiner Funktion behindert wird, scheint diese Erkenntnis nachvollziehbar. Im Vergleich zum Ergebnis dieser Gruppe lässt sich bei der Gruppe der Patienten ohne PML eine eher niedrigere Affinität der Antikörper beobachten. Der Grund hierfür dürfte erneut in der mangelnden Aktivität des JC-Virus in diesen Patienten liegen. Das Virus zirkuliert nicht im Blut und es kommt daher nicht zu einem Ansteigen der Menge und der Affinität der Antikörper. Es ist hier aber festzuhalten, dass es sich bei den beschriebenen Unterschieden nur um Tendenzen handelt, die statistisch nicht signifikant unterschiedlich sind.

Grundsätzlich kann die Frage gestellt werden, ob der von uns gewählte Versuchsaufbau für die Messung der Affinität der Antikörper geeignet ist. Ein kommerzieller Test, wie es ihn für gegen andere Krankheitserreger gerichtete Antikörper gibt, ist derzeit nicht verfügbar. Da der von uns verwendete Ansatz auf dem bereits etablierten ELISA zur Bestimmung der anti-JCV-IgG Menge beruht und die Konkurrenz zur Lösung der Antigen/Antikörper-Komplexe mit dem gleichen rekombinanten VP-1 durchgeführt wurden, das auch zur Beschichtung der Mikrotiterplatten verwendet wurde, ist der Versuchsaufbau aus unserer Sicht geeignet. Es sollten hier jedoch gegebenenfalls noch weiterführende Untersuchungen an anderen Patientenkollektiven durchgeführt werden, um die von uns beschriebenen Ergebnisse zu bestätigen.

Als problematisch könnte sich hier die relativ niedrige Anzahl an von uns untersuchten Patientenproben erweisen. Eine Erhöhung der Probenzahl könnte zu klareren Mittelwerten und damit zu einer besseren statistischen Auswertung beitragen.

## 4.8 PCR-JCV

In unseren Untersuchungen zeigte sich hinsichtlich der Menge der in den Serum- und Liquorproben gefundenen JCV-DNA-Kopien eine große Spannweite an Befunden. Dies zeigte sich insbesondere bei den im Anschluss durchgeführten Berechnungen der Unterschiede zwischen den Gruppen, bei denen sich keine signifikanten Unterschiede ergaben. Hier zeigt sich die Schwäche einer nur auf den PCR-Nachweis beruhenden Diagnostik einer PML auf. Ihre Sensitivität schwankte in verschiedenen Studien zwischen 60 und 95%.<sup>13,14,57</sup> Natürlich kann die Nachweisgrenze der angewandten PCR als Einflussfaktor diskutiert werden. Allerdings ist zu beachten, dass auch wenn die Nachweisgrenze der meisten kommerziellen Laboratorien bei <200 Kopien/ml liegt, die Aussagekraft der Messung einer sehr geringen Viruslast bisher nicht geklärt ist.<sup>39</sup> Auch ist die vom NIH angegebene Grenze von angeblich 10 Kopien pro Milliliter grundsätzlich zu hinterfragen. Dies würde bei den verwendeten Probengrößen rechnerisch 0,3 Kopien pro Probenansatz bedeuten.

Erfahrungen mit anderen Erregernachweisen mittels *real-time*-PCR haben zudem gezeigt, dass Ergebnisse nahe am unteren *cutoff* zum einen gelegentlich durch unspezifische Signale der dabei verwendeten farbmarkierten Sonden entstehen können, sowie je nach Arbeitsweise auch auf Laborkontaminationen beruhen können. Dem versucht man durch Wiederholung solch niedrig positiver Nachweise sowie durch Mehrfachansätze („Replikate“) zur Verbesserung der Sensitivität entgegenzuwirken.

Bei allen Einschränkungen ist der eindeutige Nachweis von JCV-DNA im Liquor dennoch als sicheres Zeichen einer PML zu werten, das heißt, er besitzt einen hohen positiven prädiktiven Wert. In keiner der Gruppen mit Patienten ohne PML wurden DNA-Kopien im Liquor gefunden, demgegenüber wurde in 88% der Liquorproben von PML-Patienten das Virus nachgewiesen.

Die PCR ist somit trotz aller Schwächen ein wichtiges Werkzeug in der PML-Diagnostik, wenn sie durch weitere Untersuchungsmethoden ergänzt wird.

## 4.9 PCR-BKV

In unserer Untersuchung konnte keine signifikante Anzahl an DNA-Kopien des BK-Virus gefunden werden. Zwar wurde in den Serumproben von 2 Patienten der Gruppe „PML mit Natalizumab“ das Virus gefunden und damit in 1,6% aller untersuchten Proben. Allerdings ergaben sich hieraus keine signifikanten Unterschiede zu den Gruppen ohne BKV-Nachweis.

Dennoch steht dies im Einklang mit Untersuchungen, die an Patienten mit Nierentransplantation durchgeführt wurden. So fanden Boobes et al. 2015 in 116 untersuchten Seren von Nierentransplantatpatienten nur in drei Fällen Virus DNA.<sup>16</sup>

Grundsätzlich scheint das Auftreten von BKV-DNA im Serum von PML-Patienten auf den ersten Blick der These, dass die JCV-Infektion vor einer gleichzeitigen Infektion mit BKV schützt, zu widersprechen.

Zu berücksichtigen ist hier jedoch auf der einen Seite, dass es sich um Ausreißer handeln könnte, welche bei Betrachtung eines größeren Kollektivs weniger ins Gewicht fallen würden. Dafür spricht die im Allgemeinen niedrige Prävalenz von BKV-DNA wie sie z.B. Boobes et al. beschrieben haben.<sup>16</sup>

Auf der anderen Seite könnte, sollte sich dieser Trend auch in größeren Kollektiven bestätigen, als Erklärung ein insgesamt reduzierter Immunstatus der PML-Patienten dienen, welcher als prädisponierend für opportunistische Erkrankungen zu sehen wäre. Außerdem ist nicht von einem signifikanten Schutz durch kreuzreaktive Antikörper auszugehen, sondern es zeigen sich lediglich statistische Unterschiede bei der Untersuchung größerer Kollektive, die im einzelnen Individuum aber nicht zum Tragen kommen müssen.

## 5 Schlussfolgerung

Die sichere und schnelle Diagnostik der PML ist die Grundlage für die Therapie und für den betroffenen Patienten damit von großer Wichtigkeit hinsichtlich seiner Prognose. Daher stellt unseren Untersuchungen zufolge der  $AI_{JCV}$  eine sinnvolle und relativ leicht durchzuführende Möglichkeit der Erweiterung der diagnostischen Möglichkeiten dar. Eine Ausweitung des Patientenkollektivs könnte hier die von uns gewonnen Erkenntnisse weiter verifizieren. Insbesondere weitere Untersuchungen zum zeitlichen Zusammenhang zwischen Anstieg des  $AI_{JCV}$  und der klinischen Entwicklung einer PML wären hierbei von Interesse.

Insgesamt sollten die durchgeführten Untersuchungen weitergeführt werden, um die Streubreite der von uns erhobenen Daten zu verringern. Hier ist insbesondere der Zusammenhang zwischen JCV-Infektion und dem damit möglicherweise verbundenen Schutz vor einer PML-Manifestation durch eine zuvor erfolgte Infektion mit dem BK-Virus von Interesse. Die sichtbaren Tendenzen in unseren Daten könnten dadurch möglicherweise statistisch belegt werden.

Auch eine Studie zu einer möglichen Veränderung der Anteile der gebildeten IgG-Subtypen im zeitlichen Verlauf einer PML würde mehr Patienten mit vorhandenen Verlaufsproben voraussetzen. Wünschenswert wären einheitlichere zeitliche Abstände zwischen den Probenentnahmen, wobei dies klinisch vermutlich schwer durchführbar bleibt.

Solange es keine Impfung gegen das JC-Virus oder eine Möglichkeit der kausalen Behandlung einer PML gibt, bleibt es weiterhin nötig, zur frühen Erkennung der Erkrankung nach weiteren Möglichkeiten der Diagnostik sowie nach den immunologischen Zusammenhängen dieser schwerwiegenden Erkrankung zu suchen. So bleiben spezifische Risikofaktoren für eine Erkrankung weiterhin im Dunkeln und erfordern der weitergehenden Untersuchung.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] H. T. Agostini, C. F. Ryschkewitsch, G. R. Brubaker, J. Shao, and G. I. Stoner. Five complete genomes of jc virus type 3 from africans and african americans. *Arch Virol*, 142(4):637–655, 1997.
- [2] H. T. Agostini, C. F. Ryschkewitsch, R. Mory, E. J. Singer, and G. L. Stoner. Jc virus (jcv) genotypes in brain tissue from patients with progressive multifocal leukoencephalopathy (pml) and in urine from controls without pml: increased frequency of jcv type 2 in pml. *J Infect Dis*, 176(1):1–8, 1997.
- [3] H. T. Agostini, C. F. Ryschkewitsch, E. J. Singer, and G. L. Stoner. Co-infection with two jc virus genotypes in brain, cerebrospinal fluid or urinary tract detected by direct cycle sequencing of pcr products. *J Neurovirol*, 2(4):259–267, 1996.
- [4] H. T. Agostini, C. F. Ryschkewitsch, and G. L. Stoner. Genotype profile of human polyomavirus jc excreted in urine of immunocompetent individuals. *J Clin Microbiol*, 34(1):159–164, 1996.
- [5] H. T. Agostini, Y. Shishido-Hara, R. W. Baumhefner, E. J. Singer, C. F. Ryschkewitsch, and G. L. Stoner. Jc virustype 2: definition of subtypes based on dna sequence analysis of ten complete genomes. *J Gen Virol*, 79 ( Pt 5):1143–1151, 1998.
- [6] H. T. Agostini and G. L. Stoner. Amplification of the complete polyomavirus jc genome from brain, cerebrospinal fluid and urine using pre-pcr restriction enzyme digestion. *J Neurovirol*, 1(3-4):316–320, 1995.
- [7] H. T. Agostini, R. Yanagihara, V. Davis, C. F. Ryschkewitsch, and G. L. Stoner. Asian genotypes of jc virus in native americans and in a pacific island population: markers of viral evolution and human migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(26):14542–14546, 1997.
- [8] A. Ashok and W. J. Atwood. Contrasting roles of endosomal ph and the cytoskeleton in infection of human glial cells by jc virus and simian virus 40. *J Virol*, 77(2):1347–1356, 2003.
- [9] B. Assetta, M. S. Maginnis, I. Gracia Ahufinger, S. A. Haley, G. V. Gee, C. D. Nelson, B. A. O’Hara, S. A. Allen Ramdial, and W. J. Atwood. 5-ht2 receptors facilitate jc polyomavirus entry. *J Virol*, 87(24):13490–13498, 2013.
- [10] K. E. Astrom, E. L. Mancall, and Richardson, E. P., Jr. Progressive multifocal leuko-encephalopathy; a hitherto unrecognized complication of chronic lymphatic leukaemia and hodgkin’s disease. *Brain*, 81(1):93–111, 1958.
- [11] G. S. Ault and G. L. Stoner. Two major types of jc virus defined in progressive multifocal leukoencephalopathy brain by early and late coding region dna sequences. *J Gen Virol*, 73 ( Pt 10):2669–2678, 1992.
- [12] R. E. Bartt. Multiple sclerosis, natalizumab therapy, and progressive multifocal leukoencephalopathy. *Curr Opin Neurol*, 19(4):341–349, 2006.

- [13] J. R. Berger, A. J. Aksamit, D. B. Clifford, L. Davis, I. J. Koranik, J. J. Sejvar, R. Bartt, E. O. Major, and A. Nath. Pml diagnostic criteria: consensus statement from the aan neuroinfectious disease section. *Neurology*, 80(15):1430–1438, 2013.
- [14] A. Bhaskaran, L. Racsa, R. Gander, P. Southern, D. Cavuoti, and A. Alatoon. Interpretation of positive molecular tests of common viruses in the cerebrospinal fluid. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 77(3):236–240, 2013.
- [15] R. Boldorini, R. Caldarelli-Stefano, G. Monga, M. Zocchi, M. Mediati, A. Tosoni, and P. Ferrante. Pcr detection of jc virus dna in the brain tissue of a 9-year-old child with pleomorphic xanthoastrocytoma. *J Neurovirol*, 4(2):242–245, 1998.
- [16] Y. Boobes, B. Bernieh, Q. Hussain, H. Al Omary, M. R. Al Hakim, F. Abayechi, H. El Jack, I. Khan, and M. Ahmed. Prevalence of polyomavirus among united arab emirates kidney transplant recipients: results from a single center. *Transplant Proc*, 47(4):1143–1145, 2015.
- [17] K. A. Brokstad, R. J. Cox, D. Major, J. M. Wood, and L. R. Haaheim. Cross-reaction but no avidity change of the serum antibody response after influenza vaccination. *Vaccine*, 13(16):1522–1528, 1995.
- [18] S. Calvignac-Spencer, M. C. Feltkamp, M. D. Daugherty, U. Moens, T. Ramqvist, R. Johne, and B. Ehlers. A taxonomy update for the family polyomaviridae. *Archives of virology*, 161(6):1739–1750, 2016.
- [19] J. B. Cavanagh, D. Greenbaum, A. H. Marshall, and L. J. Rubinstein. Cerebral demyelination associated with disorders of the reticuloendothelial system. *Lancet*, 2(7102):524–529, 1959.
- [20] I. M. Cayres-Vallinoto, A. C. Vallinoto, V. N. Azevedo, L. F. Machado, O. Ishak Mde, and R. Ishak. Human jcv infections as a bio-anthropological marker of the formation of brazilian amazonian populations. *PLoS One*, 7(10):e46523, 2012.
- [21] E. T. Clayson, L. V. Brando, and R. W. Compans. Release of simian virus 40 virions from epithelial cells is polarized and occurs without cell lysis. *J Virol*, 63(5):2278–2288, 1989.
- [22] D. B. Clifford, A. de Luca, A. DeLuca, D. M. Simpson, G. Arendt, G. Giovannoni, and A. Nath. Natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy in patients with multiple sclerosis: lessons from 28 cases. *Lancet Neurol*, 9(4):438–446, 2010.
- [23] D. B. Clifford, A. Nath, P. Cinque, B. J. Brew, R. Zivadinov, L. Gorelik, Z. Zhao, and P. Duda. A study of mefloquine treatment for progressive multifocal leukoencephalopathy: results and exploration of predictors of pml outcomes. *J Neurovirol*, 19(4):351–358, 2013.
- [24] A. M. Collins and K. J. Jackson. A temporal model of human ige and igg antibody function. *Front Immunol*, 4:235, 2013.
- [25] D. M. Bourneville, L. Guérard. *De la sclérose en plaques disséminées: nouvelle étude sur quelques points de la sclérose en plaques disséminées par Bourneville*. Adrien Delahaye, Paris, 1869.
- [26] A. Darbinyan, K. M. Siddiqui, D. Slonina, N. Darbinian, S. Amini, M. K. White, and K. Khalili. Role of jc virus agnoprotein in dna repair. *J Virol*, 78(16):8593–8600, 2004.
- [27] J. A. DeCaprio, J. W. Ludlow, J. Figge, J. Y. Shew, C. M. Huang, W. H. Lee, E. Marsilio, E. Paucha, and D. M. Livingston. Sv40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell*, 54(2):275–283, 1988.

- [28] N. Dyson, R. Bernards, S. H. Friend, L. R. Gooding, J. A. Hassell, E. O. Major, J. M. Pipas, T. Vandyke, and E. Harlow. Large t antigens of many polyomaviruses are able to form complexes with the retinoblastoma protein. *J Virol*, 64(3):1353–1356, 1990.
- [29] M. E. Ewen, J. W. Ludlow, E. Marsilio, J. A. DeCaprio, R. C. Millikan, S. H. Cheng, E. Paucha, and D. M. Livingston. An n-terminal transformation-governing sequence of sv40 large t antigen contributes to the binding of both p110rb and a second cellular protein, p120. *Cell*, 58(2):257–267, 1989.
- [30] A. Ferrante, L. J. Beard, and R. G. Feldman. Igg subclass distribution of antibodies to bacterial and viral antigens. *Pediatr Infect Dis J*, 9(8 Suppl):S16–24, 1990.
- [31] Bernard N. Fields, David M. Knipe, and Peter M. Howley. *Fields virology*. Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health, Philadelphia, PA, 6th edition, 2013.
- [32] C. R. Gale and C. N. Martyn. Migrant studies in multiple sclerosis. *Prog Neurobiol*, 47(4-5):425–448, 1995.
- [33] M. L. Gasparovic, G. V. Gee, and W. J. Atwood. Jc virus minor capsid proteins vp2 and vp3 are essential for virus propagation. *J Virol*, 80(21):10858–10861, 2006.
- [34] B. Gerson, S. R. Cohen, I. M. Gerson, and G. H. Guest. Myelin basic protein, oligoclonal bands, and igg in cerebrospinal fluid as indicators of multiple sclerosis. *Clin Chem*, 27(12):1974–1977, 1981.
- [35] T. E. Gofton, A. Al-Khotani, B. O’Farrell, L. C. Ang, and R. S. McLachlan. Mefloquine in the treatment of progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 82(4):452–455, 2011.
- [36] J. Guo, T. Kitamura, H. Ebihara, C. Sugimoto, T. Kunitake, J. Takehisa, Y. Q. Na, M. N. Al-Ahdal, A. Hallin, K. Kawabe, F. Taguchi, and Y. Yogo. Geographical distribution of the human polyomavirus jc virus type a and b and isolation of a new type from ghana. *J Gen Virol*, 77 ( Pt 5):919–927, 1996.
- [37] K. F. Harris, J. B. Christensen, and M. J. Imperiale. Bk virus large t antigen: interactions with the retinoblastoma family of tumor suppressor proteins and effects on cellular growth control. *J Virol*, 70(4):2378–2386, 1996.
- [38] T. Hein and W. Hopfenmuller. [projection of the number of multiple sclerosis patients in germany]. *Nervenarzt*, 71(4):288–294, 2000.
- [39] E. Iacobaeus, C. Ryschkewitsch, M. Gravell, M. Khademi, E. Wallstrom, T. Olsson, L. Brundin, and E. Major. Analysis of cerebrospinal fluid and cerebrospinal fluid cells from patients with multiple sclerosis for detection of jc virus dna. *Mult Scler*, 15(1):28–35, 2009.
- [40] T. Iida, T. Kitamura, J. Guo, F. Taguchi, Y. Aso, K. Nagashima, and Y. Yogo. Origin of jc polyomavirus variants associated with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(11):5062–5065, 1993.
- [41] S. Jarius, P. Eichhorn, C. Jacobi, B. Wildemann, M. Wick, and R. Voltz. The intrathecal, polyspecific antiviral immune response: Specific for ms or a general marker of cns autoimmunity? *J Neurol Sci*, 280(1-2):98–100, 2009.
- [42] I. Jelcic, B. Combaluzier, W. Faigle, L. Senn, B. J. Reinhart, L. Stroh, R. M. Nitsch, T. Stehle, M. Sospedra, J. Grimm, and R. Martin. Broadly neutralizing human monoclonal jc polyomavirus vp1-specific antibodies as candidate therapeutics for progressive multifocal leukoencephalopathy. *Sci Transl Med*, 7(306):306ra150, 2015.

- [43] R. Johne, C. B. Buck, T. Allander, W. J. Atwood, R. L. Garcea, M. J. Imperiale, E. O. Major, T. Ramqvist, and L. C. Norkin. Taxonomical developments in the family polyomaviridae. *Arch Virol*, 156(9):1627–1634, 2011.
- [44] W. A. Knowles, R. W. Luxton, J. F. Hand, S. D. Gardner, and D. W. Brown. The jc virus antibody response in serum and cerebrospinal fluid in progressive multifocal leucoencephalopathy. *Clin Diagn Virol*, 4(2):183–194, 1995.
- [45] W. A. Knowles, D. Pillay, M. A. Johnson, J. F. Hand, and D. W. Brown. Prevalence of long-term bk and jc excretion in hiv-infected adults and lack of correlation with serological markers. *J Med Virol*, 59(4):474–479, 1999.
- [46] W. A. Knowles, P. Pipkin, N. Andrews, A. Vyse, P. Minor, D. W. Brown, and E. Miller. Population-based study of antibody to the human polyomaviruses bkv and jcv and the simian polyomavirus sv40. *J Med Virol*, 71(1):115–123, 2003.
- [47] I. J. Koralnik, D. Boden, V. X. Mai, C. I. Lord, and N. L. Letvin. Jc virus dna load in patients with and without progressive multifocal leucoencephalopathy. *Neurology*, 52(2):253–60, Jan 15 1999. Koralnik, I J Boden, D Mai, V X Lord, C I Letvin, N L ENG AI-20729/AI/NIAID NIH HHS/NS-01919/NS/NINDS NIH HHS/ Research Support, U.S. Gov’t, P.H.S. 1999/02/05 Neurology. 1999 Jan 15;52(2):253-60.
- [48] T. Kuhlmann, G. Lingfeld, A. Bitsch, J. Schuchardt, and W. Bruck. Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain*, 125(Pt 10):2202–2212, 2002.
- [49] L. Laghi, A. E. Randolph, D. P. Chauhan, G. Marra, E. O. Major, J. V. Neel, and C. R. Boland. Jc virus dna is present in the mucosa of the human colon and in colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(13):7484–7489, 1999.
- [50] A. Langer-Gould, S. W. Atlas, A. J. Green, A. W. Bollen, and D. Pelletier. Progressive multifocal leucoencephalopathy in a patient treated with natalizumab. *N Engl J Med*, 353(4):375–381, 2005.
- [51] O. J. Leger, T. A. Yednock, L. Tanner, H. C. Horner, D. K. Hines, S. Keen, J. Saldanha, S. T. Jones, L. C. Fritz, and M. M. Bendig. Humanization of a mouse antibody against human alpha-4 integrin: a potential therapeutic for the treatment of multiple sclerosis. *Hum Antibodies*, 8(1):3–16, 1997.
- [52] D. Li, R. Zhao, W. Lilyestrom, D. Gai, R. Zhang, J. A. DeCaprio, E. Fanning, A. Jochimiak, G. Szakonyi, and X. S. Chen. Structure of the replicative helicase of the oncoprotein sv40 large tumour antigen. *Nature*, 423(6939):512–518, 2003.
- [53] A. Marzocchetti, S. Di Giambenedetto, A. Cingolani, A. Ammassari, R. Cauda, and A. De Luca. Reduced rate of diagnostic positive detection of jc virus dna in cerebrospinal fluid in cases of suspected progressive multifocal leucoencephalopathy in the era of potent antiretroviral therapy. *J Clin Microbiol*, 43(8):4175–7, Aug 2005. Marzocchetti, Angela Di Giambenedetto, Simona Cingolani, Antonella Ammassari, Adriana Cauda, Roberto De Luca, Andrea ENG Research Support, Non-U.S. Gov’t 2005/08/06 09:00 J Clin Microbiol. 2005 Aug;43(8):4175-7.
- [54] C. F. Mattern, K. K. Takemoto, and W. A. Daniel. Replication of polyoma virus in mouse embryo cells: electron microscopic observations. *Virology*, 30(2):242–256, 1966.

- 
- [55] W. I. McDonald, A. Compston, G. Edan, D. Goodkin, H. P. Hartung, F. D. Lublin, H. F. McFarland, D. W. Paty, C. H. Polman, S. C. Reingold, M. Sandberg-Wollheim, W. Sibley, A. Thompson, S. van den Noort, B. Y. Weinshenker, and J. S. Wolinsky. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 50(1):121–127, 2001.
- [56] G. Meinke, P. J. Phelan, R. Kalekar, J. Shin, J. Archambault, A. Bohm, and P. A. Bullock. Insights into the initiation of jc virus dna replication derived from the crystal structure of the t-antigen origin binding domain. *PLoS Pathog*, 10(2):e1003966, 2014.
- [57] D. Mentzer, J. Prestel, O. Adams, R. Gold, H. P. Hartung, H. Hengel, B. C. Kieseier, W. D. Ludwig, and B. Keller-Stanislawski. Case definition for progressive multifocal leukoencephalopathy following treatment with monoclonal antibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 83(9):927–933, 2012.
- [58] U. Neu, M. S. Maginnis, A. S. Palma, L. J. Stroh, C. D. Nelson, T. Feizi, W. J. Atwood, and T. Stehle. Structure-function analysis of the human jc polyomavirus establishes the lstc pentasaccharide as a functional receptor motif. *Cell Host Microbe*, 8(4):309–319, 2010.
- [59] L. C. Norkin and J. Ouellette. Cell killing by simian virus 40: variation in the pattern of lysosomal enzyme release, cellular enzyme release, and cell death during productive infection of normal and simian virus 40-transformed simian cell lines. *J Virol*, 18(1):48–57, 1976.
- [60] Y. Okada, T. Suzuki, Y. Sunden, Y. Orba, S. Kose, N. Imamoto, H. Takahashi, S. Tanaka, W. W. Hall, K. Nagashima, and H. Sawa. Dissociation of heterochromatin protein 1 from lamin b receptor induced by human polyomavirus agnoprotein: role in nuclear egress of viral particles. *EMBO Rep*, 6(5):452–457, 2005.
- [61] B. L. Padgett, C. M. Rogers, and D. L. Walker. Jc virus, a human polyomavirus associated with progressive multifocal leukoencephalopathy: additional biological characteristics and antigenic relationships. *Infect Immun*, 15(2):656–662, 1977.
- [62] B. L. Padgett and D. L. Walker. Prevalence of antibodies in human sera against jc virus, an isolate from a case of progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Infect Dis*, 127(4):467–470, 1973.
- [63] B. L. Padgett, D. L. Walker, G. M. ZuRhein, R. J. Eckroade, and B. H. Dessel. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Lancet*, 1(7712):1257–1260, 1971.
- [64] B. L. Padgett, D. L. Walker, G. M. ZuRhein, and J. N. Varakis. Differential neurooncogenicity of strains of jc virus, a human polyoma virus, in newborn syrian hamsters. *Cancer Res*, 37(3):718–720, 1977.
- [65] D. C. Pallas, L. K. Shahrik, B. L. Martin, S. Jaspers, T. B. Miller, D. L. Brautigan, and T. M. Roberts. Polyoma small and middle t antigens and sv40 small t antigen form stable complexes with protein phosphatase 2a. *Cell*, 60(1):167–176, 1990.
- [66] M. T. Pho, A. Ashok, and W. J. Atwood. Jc virus enters human glial cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *J Virol*, 74(5):2288–2292, 2000.
- [67] S. J. Pittock, W. T. Mayr, R. L. McClelland, N. W. Jorgensen, S. D. Weigand, J. H. Noseworthy, B. G. Weinshenker, and M. Rodriguez. Change in ms-related disability in a population-based cohort: a 10-year follow-up study. *Neurology*, 62(1):51–59, 2004.

- [68] C. H. Polman, P. W. O'Connor, E. Havrdova, M. Hutchinson, L. Kappos, D. H. Miller, J. T. Phillips, F. D. Lublin, G. Giovannoni, A. Wajgt, M. Toal, F. Lynn, M. A. Panzara, A. W. Sandroock, and Affirm Investigators. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 354(9):899–910, 2006.
- [69] C. H. Polman, S. C. Reingold, B. Banwell, M. Clanet, J. A. Cohen, M. Filippi, K. Fujihara, E. Havrdova, M. Hutchinson, L. Kappos, F. D. Lublin, X. Montalban, P. O'Connor, M. Sandberg-Wollheim, A. J. Thompson, E. Waubant, B. Weinshenker, and J. S. Wolinsky. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the mcdonald criteria. *Ann Neurol*, 69(2):292–302, 2011.
- [70] C. H. Polman, S. C. Reingold, G. Edan, M. Filippi, H. P. Hartung, L. Kappos, F. D. Lublin, L. M. Metz, H. F. McFarland, P. W. O'Connor, M. Sandberg-Wollheim, A. J. Thompson, B. G. Weinshenker, and J. S. Wolinsky. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "mcdonald criteria". *Ann Neurol*, 58(6):840–846, 2005.
- [71] Prof. Dr. Ralf Gold. Diagnose und therapie der multiplen sklerose, 2012.
- [72] Q. Qu, H. Sawa, T. Suzuki, S. Semba, C. Henmi, Y. Okada, M. Tsuda, S. Tanaka, W. J. Atwood, and K. Nagashima. Nuclear entry mechanism of the human polyomavirus jc virus-like particle: role of importins and the nuclear pore complex. *J Biol Chem*, 279(26):27735–27742, 2004.
- [73] P. S. Randhawa, G. Gupta, A. Vats, R. Shapiro, and R. P. Viscidi. Immunoglobulin g, a, and m responses to bk virus in renal transplantation. *Clin Vaccine Immunol*, 13(9):1057–1063, 2006.
- [74] U. Ray, P. Cinque, S. Gerevini, V. Longo, A. Lazzarin, S. Schippling, R. Martin, C. B. Buck, and D. V. Pastrana. Jc polyomavirus mutants escape antibody-mediated neutralization. *Sci Transl Med*, 7(306):306ra151, 2015.
- [75] A. Rencic, J. Gordon, J. Otte, M. Curtis, A. Kovatich, P. Zoltick, K. Khalili, and D. Andrews. Detection of jc virus dna sequence and expression of the viral oncoprotein, tumor antigen, in brain of immunocompetent patient with oligoastrocytoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(14):7352–7357, 1996.
- [76] Richardson, E. P., Jr. Progressive multifocal leukoencephalopathy. *N Engl J Med*, 265:815–823, 1961.
- [77] R. A. Rudick, D. Miller, S. Hass, M. Hutchinson, P. A. Calabresi, C. Confavreux, S. L. Galetta, G. Giovannoni, E. Havrdova, L. Kappos, F. D. Lublin, D. H. Miller, P. W. O'Connor, J. T. Phillips, C. H. Polman, E. W. Radue, W. H. Stuart, A. Wajgt, B. Weinstock-Guttman, D. R. Wynn, F. Lynn, M. A. Panzara, Affirm, and Sentinel Investigators. Health-related quality of life in multiple sclerosis: effects of natalizumab. *Ann Neurol*, 62(4):335–346, 2007.
- [78] A. S. Saribas, B. T. Arachea, M. K. White, R. E. Viola, and M. Safak. Human polyomavirus jc small regulatory agnoprotein forms highly stable dimers and oligomers: implications for their roles in agnoprotein function. *Virology*, 420(1):51–65, 2011.
- [79] A. S. Saribas, P. Coric, A. Hamazaspyan, W. Davis, R. Axman, M. K. White, M. Abou-Gharbia, W. Childers, J. H. Condra, S. Bouaziz, and M. Safak. Emerging from the unknown: Structural and functional features of agnoprotein of polyomaviruses. *J Cell Physiol*, 2016.
- [80] P. Seth, F. Diaz, J. H. Tao-Cheng, and E. O. Major. Jc virus induces nonapoptotic cell death of human central nervous system progenitor cell-derived astrocytes. *J Virol*, 78(9):4884–4891, 2004.
- [81] D. T. Simmons. Sv40 large t antigen functions in dna replication and transformation. *Adv Virus Res*, 55:75–134, 2000.

- [82] M. Smith. Considerations on a possible viral etiology for b-precursor acute lymphoblastic leukemia of childhood. *J Immunother*, 20(2):89–100, 1997.
- [83] E. Sontag, S. Fedorov, C. Kamibayashi, D. Robbins, M. Cobb, and M. Mumby. The interaction of sv40 small tumor antigen with protein phosphatase 2a stimulates the map kinase pathway and induces cell proliferation. *Cell*, 75(5):887–897, 1993.
- [84] T. Stehle, Y. Yan, T. L. Benjamin, and S. C. Harrison. Structure of murine polyomavirus complexed with an oligosaccharide receptor fragment. *Nature*, 369(6476):160–163, 1994.
- [85] C. S. Sullivan, A. T. Grundhoff, S. Tevethia, J. M. Pipas, and D. Ganem. Sv40-encoded micrnas regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic t cells. *Nature*, 435(7042):682–686, 2005.
- [86] B. H. Waksman and R. D. Adams. Infectious leukoencephalitis. a critical comparison of certain experimental and naturally-occurring viral leukoencephalitides with experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuropathol Exp Neurol*, 21:491–518, 1962.
- [87] C. Warnke, T. Dehmel, A. Posevitz-Fejfar, A. Chan, A. Berthele, S. Schmidt, J. Haas, H. C. Kronsbein, F. Seitz, B. Tackenberg, M. Maurer, K. Gerbershagen, V. Limmroth, O. Adams, H. P. Hartung, R. Gold, B. Hemmer, H. Wiendl, and B. C. Kieseier. Anti-jc-virus antibody prevalence in a german ms cohort. *Mult Scler*, 18(7):1054–5, Jul 2012.
- [88] C. Warnke, M. Pawlita, T. Dehmel, A. Posevitz-Fejfar, H. P. Hartung, H. Wiendl, B. C. Kieseier, and O. Adams. An assay to quantify species-specific anti-jc virus antibody levels in ms patients. *Mult Scler*, 19(9):1137–1144, 2013.
- [89] C. Warnke, G. von Geldern, P. Markwerth, T. Dehmel, R. Hoepner, R. Gold, M. Pawlita, T. Kümpfel, M. Mäurer, M. Stangel, F. Wegner, R. Hohlfeld, V. Straeten, V. Limmroth, T. Weber, D. Hermsen, C. Kleinschnitz, H. P. Hartung, M. P. Wattjes, A. Svenningsson, E. Major, T. Olsson, B. C. Kieseier, and O. Adams. The csf jcv antibody index for diagnosis of natalizumab-associated pml. *Ann Neurol*, 2014.
- [90] G. Watanabe, A. Howe, R. J. Lee, C. Albanese, I. W. Shu, A. N. Karnezis, L. Zon, J. Kyriakis, K. Rundell, and R. G. Pestell. Induction of cyclin d1 by simian virus 40 small tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(23):12861–12866, 1996.
- [91] R. Weissert. Progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neuroimmunol*, 231(1-2):73–77, 2011.
- [92] S. I. Yang, R. L. Lickteig, R. Estes, K. Rundell, G. Walter, and M. C. Mumby. Control of protein phosphatase 2a by simian virus 40 small-t antigen. *Mol Cell Biol*, 11(4):1988–1995, 1991.
- [93] Y. Yogo, T. Iida, F. Taguchi, T. Kitamura, and Y. Aso. Typing of human polyomavirus jc virus on the basis of restriction fragment length polymorphisms. *J Clin Microbiol*, 29(10):2130–2138, 1991.
- [94] T. A. Yousry, E. O. Major, C. Ryschkewitsch, G. Fahle, S. Fischer, J. Hou, B. Curfman, K. Miszkiel, N. Mueller-Lenke, E. Sanchez, F. Barkhof, E. W. Radue, H. R. Jager, and D. B. Clifford. Evaluation of patients treated with natalizumab for progressive multifocal leukoencephalopathy. *N Engl J Med*, 354(9):924–933, 2006.
- [95] G. M. zu Rhein. Polyoma-like virions in a human demyelinating disease. *Acta Neuropathol*, 8(1):57–68, 1967.

# Danksagung

Meinem Doktorvater und Betreuer Prof. Dr. med. Ortwin Adams möchte ich ganz herzlich für die Überlassung des Themas meiner Arbeit, für die jahrelange Unterstützung bei der Forschung, die vielen Stunden Korrekturlesen und für die große Geduld und Ruhe, die ich ihm bei der Fertigstellung dieser Arbeit abverlangt habe, danken.

Mein Dank gilt weiterhin der gesamten Arbeitsgruppe und den MTAs des Instituts, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen und immer ein offenes Ohr bei Problemen hatten. Ohne ihre Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ein besonderer Dank geht an meine Familie für ihre Unterstützung während des gesamten Medizinstudiums und während der Verfassung meiner Dissertation.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Freundin Anna-Elena Mull danken für ihre fortwährenden Aufmunterungen und das ausdauernde Engagement bei der Erstellung der Arbeit – danke!

# Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

15.01.2017 Philipp Pierre Markwerth