

Aus dem Institut für Virologie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Professor Dr. Jörg Timm

Die humorale Immunantwort gegen die humanen Polyomaviren JC und BK bei
Patienten mit einer Progressiven Multifokalen Leukenzephalopathie (PML) im
Vergleich zu einem Kontrollkollektiv

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Marcel Andrée

2019

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Ortwin Adams

Zweitgutachter: Prof. Dr. Orhan Aktas

I Zusammenfassung

Die Progressive multifokale Leukoencephalopathie (PML) wird durch das JC-Polyomavirus (JCV) verursacht. PML-Fälle treten im Zusammenhang mit einer schweren Beeinträchtigung des Immunsystems, wie HIV/AIDS oder einer Behandlung mit immunmodulatorischen monoklonalen Antikörpern, wie Natalizumab und Rituximab, auf. Die Diagnose PML wird mithilfe des JCV-DNA-Nachweises durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) im Liquor (Zerebrospinalflüssigkeit) gestellt. Neuere Veröffentlichungen zeigen, dass einige PML-Patienten „blinde Flecken“ in der humoralen Antwort gegen JCV aufweisen und bei ihnen neutralisierende Antikörper gegen JCV-VP1-Mutanten einschließlich des eng verwandten Polyomavirus BK fehlen (1).

Unser Ziel war es, Serum-JCV- und Serum-BKV-Antikörper-Aktivitäten bei Patienten mit PML zu messen und mit einer Kontrollgruppe zu vergleichen. Wir verwendeten einen zweistufigen ELISA mit Polyomavirus VP1, fusioniert mit Glutathion-S-Transferase (GST) als Antigen, um den Infektionsstatus und das Ausmaß der Antikörperantwort in Arbitrary Units (AU) gegenüber JCV und BKV zu bestimmen. Es wurden Patienten mit Erstdiagnose PML (n = 67) und Kontrollpatienten (n = 77) ohne PML miteinander verglichen. Alle Proben der beiden Gruppen wurden randomisiert und sowohl für JCV- als auch für BKV-Antikörper parallel getestet. In Kontrollpatienten konnte eine höhere Seroprävalenz für BKV- als für JCV-Antikörper gefunden werden (88,3 % gegenüber 72,7 %, p = 0,019). Bei Kontrollpatienten sind die BKV-Antikörper-Aktivitäten höher als die JCV-Antikörper-Aktivitäten (450,5 AU/ml gegenüber 137 AU/ml, p < 0,0001). Bei PML-Patienten war die Seroprävalenz gegen JCV höher als in der Kontrollgruppe (94 % gegenüber 72,7 %, p = 0.001). Bei Patienten mit PML war die Seroprävalenz gegen BKV gegenüber der Kontrollgruppe überraschend signifikant niedriger (74,6 % versus 88,3, p = 0.008). PML-Patienten zeigen signifikant höhere Konzentrationen an JCV-Antikörpern als Kontrollpatienten (Mittelwert 446,3 AU/ml gegenüber 137 AU/ml, p < 0.0001), während BKV-Antikörper nicht signifikant unterschiedlich sind (Mittelwert 450 AU gegenüber 383,1 AU, p = 0.16). Berechnet man für jedes Individuum den JCV/BKV-Quotienten, zeigen sich hoch signifikante (3,2 gegenüber 0,49, p < 0,0001) Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

II Abstract

Progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) is caused by the JC polyomavirus (JCV). PML cases are usually associated with severe impairment of the immune system, such as HIV/AIDS, or treatment with immunomodulatory monoclonal antibodies, such as Natalizumab and Rituximab. PML is diagnosed using JCV DNA detection by polymerase chain reaction (PCR) in cerebrospinal fluid. Recent publications show that some PML patients have "blind spots" in their humoral response to JCV and lack neutralizing antibodies against JCV-VP1 mutants, including the closely related polyomavirus BK (1).

Our goal was to measure and compare serum JCV and serum BKV antibody activity in patients with PML and in a control group. We used a two-step ELISA with polyomavirus VP1, fused with glutathione S transferase (GST) as antigen to determine the infection status and extent of antibody response in arbitrary units (AU) to JCV and BKV. Patients with initial diagnosis of PML (n = 67) and control patients (n = 77) without PML were compared. All samples of the two groups were randomized and tested in parallel for both JCV and BKV antibodies. In control patients, higher seroprevalence was found for BKV antibodies than for JCV antibodies (88.3 % versus 72.7 %, p = 0.019). In control patients, BKV antibody activity is higher than JCV antibody activity (450.5 AU/ml versus 137 AU/ml, p < 0.0001). In PML patients, seroprevalence against JCV was higher than in the control group (94 % versus 72.7 %, p = 0.001). In patients with PML, seroprevalence against BKV was surprisingly significantly lower compared to the control group (74.6 % versus 88.3, p = 0.008). PML patients showed significantly higher concentrations of JCV antibodies than control patients (mean 446.3 AU/ml versus 137 AU/ml, p < 0.0001), while BKV antibodies were not significantly different (mean 450 AU versus 383.1 AU, p = 0.16). If the JCV/BKV quotient is calculated for each individual, highly significant (3.2 versus 0.49, p < 0.0001) differences between the two groups are found.

III Abkürzungen und Einheiten

Abkürzungen

AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
Aqua dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
bzw.	beziehungsweise
Cat.	Catalogue
C-Terminus	Carboxyterminus
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
HIV	Human immunodeficiency virus
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid

LB	lysogeny broth
mRNA	messenger ribonucleic acid (messenger Ribonukleinsäure)
Min-TE	Minimal-Tris-EDTA
No.	number
N-Terminus	Aminoterminus
Ø	Durchmesser, Durchschnitt
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	$-\log[H^+]$
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium-dodecylsulfat
Sulfo-SMPB	Sulfosuccinimidyl 4-[p-maleimidophenyl]butyrate
SV40	Simian Virus 40
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
USA	United States of America
UV	Ultraviolettstrahlung
v/v	Volumen pro Volumen
SE	Standard Error (Standardabweichung)

Einheiten

°C	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromol/Liter
ca.	circa
g	Erdbeschleunigung
h	Hora (Stunde)
l	Liter
M	mol/Liter
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol/Liter
ng	Nanogramm
OD	optische Dichte
rpm	revolutions per minute (Umdrehung pro Minute)
sek	Sekunde
U	Unit

IV Inhaltsverzeichnis

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	DAS JC- UND BK-VIRUS	1
1.2	STRUKTUR DER POLYOMAVIREN	2
1.3	GENOM DER POLYOMAVIREN	2
1.4	PROTEINE DER POLYOMAVIREN	3
1.5	SCHRITTE DER REPLIKATION	5
1.6	DIE JC- UND BK-VIREN ALS PATHOGENE ERREGER	6
1.7	PROGRESSIVE MULTIFOKALE LEUKENZEPHALOPATHIE (PML).....	8
1.7.1	DER HUMANISIERTE, MONOKLONALE ANTIKÖRPER NATALIZUMAB (TYSABRI®)	10
1.7.2	RISIKOSTRATIFIZIERUNG MITTELS JCV-SEROLOGIE	11
1.7.3	PATHOGENESE DER PROGRESSIVEN MULTIFOKALEN LEUKENZEPHALOPATHIE	11
1.7.4	THERAPIE DER PROGRESSIVEN MULTIFOKALEN LEUKENZEPHALOPATHIE	12
1.8	DIAGNOSTIK	13
1.9	MÖGLICHE INTERFERENZEN ZWISCHEN BKV- UND JCV-INFEKTIONEN.....	14
1.10	ZIELSETZUNG	15
2	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	16
2.1	MATERIAL	16
2.1.1	MATERIALIEN ARBEITSPLATZÜBERGREIFEND	16
2.1.2	ENZYME.....	17
2.1.3	ANTI-KÖRPER	17
2.1.4	KITS.....	17
2.1.5	SOFTWARE.....	17
2.1.6	GERÄTE	18
2.1.7	CHEMIKALIEN, MEDIEN UND LÖSUNGEN.....	19
2.1.8	ESCHERICHIA COLI STÄMME	19
2.1.9	REKOMBINANTE PLASMIDE.....	19
2.2	METHODEN	21
2.2.1	TRANSFORMATION KOMPETENTER <i>E. COLI</i> BAKTERIEN MIT PLASMID-DNA	21
2.2.2	HERSTELLUNG EINER VORKULTUR MIT TRANSFORMIERTEN <i>E. COLI</i> BAKTERIEN	21
2.2.3	PRÄPARATIVE PLASMID-ISOLIERUNG („MAXI-PRÄP“).....	21
2.2.4	JCV-ANTI-KÖRPER-MESSUNG IM ELISA.....	22

2.2.5	IPTG-INDUKTION VON CHEMISCH KOMPETENTEN <i>E. COLI</i> ZUR ANTIGENGEWINNUNG	22
2.2.6	ANTIGEN-BINDUNG ÜBER GLUTATHION-CASEIN	23
2.2.7	ENZYM-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)	24
2.3	STUDIENDESIGN	34
2.3.1	ETHIKVOTUM	34
2.3.2	TESTUNG DER PROBEN	34
3	<u>ERGEBNISSE</u>	36
3.1	SEROPRÄVALENZ DES JC- UND BK-VIRUS IN DER PML-GRUPPE UND IN DER KONTROLLGRUPPE	36
3.2	SEROPRÄVALENZ DES JC- UND BK-VIRUS IN DER PML-GRUPPE UND IN DER KONTROLLGRUPPE BEI MS-PATIENTEN UNTER NATALIZUMAB THERAPIE	43
3.3	ELISA ZUR SEQUENTIELLEN, SEROLOGISCHEN UNTERSUCHUNG AUSGESUCHTER PML-PATIENTEN	50
4	<u>DISKUSSION</u>	56
4.1	JCV UND BKV SEROPRÄVALENZ IM VERGLEICH ZUR AKTUELLEN LITERATUR	56
4.2	KREUZPROTEKTION ZWISCHEN DEN POLYOMAVIREN JC UND BK	57
4.3	KREUZREAKTIONEN ZWISCHEN DEN POLYOMAVIREN JC UND BK	58
4.4	DER STELLENWERT DER POLYOMAVIRUS-SEROLOGIE IN DER DIAGNOSTIK DER PML	59
5	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	62

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: PGEX-PLASMID.....	20
ABBILDUNG 2: PMAL-PLASMID.....	20
ABBILDUNG 3: JCV-ANTIKÖRPER-AKTIVITÄT VON SEROPOSITIVEN PATIENTEN IN DER PML-GRUPPE UND DER KONTROLLGRUPPE:.....	39
ABBILDUNG 4: BKV-ANTIKÖRPER-AKTIVITÄT VON SEROPOSITIVEN PATIENTEN IN DER PML-GRUPPE UND DER KONTROLLGRUPPE:.....	40
ABBILDUNG 5: JCV/BKV-ANTIKÖRPER- QUOTIENT VON SEROPOSITIVEN PATIENTEN DER PML-GRUPPE:.....	41
ABBILDUNG 6: JCV/BKV-ANTIKÖRPER-QUOTIENT VON SEROPOSITIVEN PATIENTEN DER KONTROLLGRUPPE:.....	41
ABBILDUNG 7: ROC-KURVE FÜR DIE BESTIMMUNG DER JCV-ANTIKÖRPERAKTIVITÄT ZUR WAHRSCHEINLICHKEIT DES VORLIEGENS EINER PML:.....	42
ABBILDUNG 8: ROC-KURVE FÜR DIE BESTIMMUNG DES JCV/BKV-ANTIKÖRPER- QUOTIENTEN ZUR WAHRSCHEINLICHKEIT DES VORLIEGENS EINER PML	43
ABBILDUNG 9: JCV-ANTIKÖRPER-AKTIVITÄT VON SEROPOSITIVEN MS-PATIENTEN UNTER NATALIZUMAB THERAPIE IN DER KONTROLLGRUPPE UND PATIENTEN DER PML-GRUPPE:	46
ABBILDUNG 10: BKV-ANTIKÖRPER-AKTIVITÄT VON SEROPOSITIVEN MS-PATIENTEN UNTER NATALIZUMAB-THERAPIE IN DER KONTROLLGRUPPE UND PATIENTEN DER PML-GRUPPE:	47
ABBILDUNG 11: JCV/BKV-ANTIKÖRPER- QUOTIENT VON SEROPOSITIVEN MS-PATIENTEN UNTER NATALIZUMAB-THERAPIE IN DER KONTROLLGRUPPE UND PATIENTEN DER PML-GRUPPE:	48
ABBILDUNG 12: ROC-KURVE FÜR DIE BESTIMMUNG DER JCV-ANTIKÖRPERAKTIVITÄT ZUR WAHRSCHEINLICHKEIT DES VORLIEGENS EINER PML BEI MS-PATIENTEN UNTER NATALIZUMAB-THERAPIE:.....	49
ABBILDUNG 13: ROC-KURVE FÜR DIE BESTIMMUNG DES JCV/BKV-ANTIKÖRPER- QUOTIENTEN ZUR WAHRSCHEINLICHKEIT DES VORLIEGENS EINER PML BEI MS- PATIENTEN UNTER NATALIZUMAB-THERAPIE	49
ABBILDUNG 14: JCV UND BKV-ANTIKÖRPER-AKTIVITÄT IM SERUM (OBEN) UND IM LIQUOR (UNTEN) EINER 1980 GEBORENEN PATIENTIN MIT DER DIAGNOSE PML.....	50
ABBILDUNG 15: JCV UND BKV-ANTIKÖRPER-AKTIVITÄT IM SERUM (OBEN) UND IM LIQUOR (UNTEN) EINER 1985 GEBORENEN PATIENTIN MIT DER DIAGNOSE PML.....	51
ABBILDUNG 16: JCV UND BKV-ANTIKÖRPER-AKTIVITÄT IM SERUM (OBEN) UND IM LIQUOR (UNTEN) EINER 1962 GEBORENEN PATIENTIN MIT DER DIAGNOSE PML.....	52
ABBILDUNG 17: JCV UND BKV-ANTIKÖRPER-AKTIVITÄT IM SERUM (OBEN) UND IM LIQUOR (UNTEN) EINER 1962 GEBORENEN PATIENTIN MIT DER DIAGNOSE PML.....	53
ABBILDUNG 18: JCV UND BKV-ANTIKÖRPER-AKTIVITÄT IM SERUM (OBEN) UND IM LIQUOR (UNTEN) EINER 1944 GEBORENEN PATIENTIN MIT DER DIAGNOSE PML.....	54

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: CHARAKTERISTISCHE VERTRETER DER POLYOMAVIREN NACH (7)	2
TABELLE 2: DURCH BK- UND JC-VIREN VERURSACHTE KRANKHEITEN NACH (4)	7
TABELLE 3: THERAPIEINDUZIERTE FÄLLE VON PROGRESSIVER MULTIFOKALER LEUKENZEPHALOPATHIE (66, 67).....	10
TABELLE 4: BELEGUNGSSCHEMA FÜR DEN ELISA:	26
TABELLE 5: PIPETTIERSCHEMA DER VORVERDÜNNUNGSPLATTE:	27
TABELLE 6: PIPETTIERSCHEMA DER ELISA-PLATTE 1: ZUGABE VON CASEIN- BLOCKIERUNGSPUFFER:	28
TABELLE 7: PIPETTIERSCHEMA DER ELISA-PLATTE 1: ZUGABE VON SERUM- VORVERDÜNNUNG:	29
TABELLE 8: BELEGUNGSSCHEMA FÜR DEN ELISA (SERUM/LIQUOR PARALLEL TESTUNG):	30
TABELLE 9: PIPETTIERSCHEMA DER VORVERDÜNNUNGSPLATTE (SERUM/LIQUOR PARALLEL TESTUNG):.....	31
TABELLE 10: PIPETTIERSCHEMA DER ELISA-PLATTE 1: ZUGABE VON CASEIN- BLOCKIERUNGSPUFFER (SERUM/LIQUOR PARALLEL TESTUNG):.....	32
TABELLE 11: PIPETTIERSCHEMA DER ELISA-PLATTE 1: ZUGABE VON SERUM- UND LIQUOR-VORVERDÜNNUNG:.....	33
TABELLE 12: CHARAKTERISTIKA DER GESAMTGRUPPE VON 144 PATIENTEN:	35
TABELLE 13: JCV - UND BKV – ANTIKÖRPER STATUS DER KONTROLLGRUPPE UND DER PML – GRUPPE:	36
TABELLE 14: JCV– UND BKV–ANTI KÖRPER-AKTIVITÄT VON SEROPOSITIVEN PATIENTEN DER KONTROLLGRUPPE UND PATIENTEN DER PML–GRUPPE:	38
TABELLE 15: JCV- UND BKV–ANTI KÖRPER STATUS DER UNTER NATALIZUMAB- THERAPIE STEHENDEN MS-PATIENTEN DER KONTROLL- UND DER PML-GRUPPE: ..	44
TABELLE 16: JCV– UND BKV–ANTI KÖRPER-AKTIVITÄT VON SEROPOSITIVEN MS- PATIENTEN UNTER NATALIZUMAB THERAPIE IN DER KONTROLLGRUPPE UND PATIENTEN DER PML–GRUPPE:	45

1 Einleitung

1.1 Das JC- und BK-Virus

Die Geschichte der Familie der *Polyomaviridae* beginnt 1953. Ludwik Gross beobachtete bei Untersuchungen des Mäuse-Leukämie-Virus (MLV), dass gesunde Tiere nach Übertragung von Zellextrakten von an Leukämie erkrankten Mäusen verschiedene Tumorerkrankungen wie Speicheldrüsentumore, Parotistumore und Leukämien entwickelten (2). 1958 isolierten Sarah Stewart und Bernice Eddy das Polyomavirus der Maus (3). Der Name „Polyoma“ leitet sich von der Eigenschaft des Virus ab, Tumore in vielen verschiedenen Organen zu erzeugen (4).

Das JC- und das BK-Virus gehören zur Familie der *Polyomaviridae*. Das JC-Virus (JCV) wurde 1971 im Gehirn eines Patienten, der an einer progressiven multifokalen Leukencephalopathie (PML) erkrankt war, isoliert (5). Die Abkürzung JC steht dabei für die Initialen dieses Patienten (John Cunningham). Das BK-Virus (BKV) wurde ebenfalls 1971 isoliert. Allerdings nicht aus Hirngewebe, sondern aus dem Urin eines Nierentransplantatempfängers, der immunsuppressiv behandelt wurde und die Initialen B.K. trug (6). Weitere human- und tierpathogene Vertreter der Polyomaviren sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Charakteristische Vertreter der Polyomaviren nach (7)

KI = Karolinska-Institut, WU = Washington University School of Medicine

Familie	Mensch	Tier
Polyomaviridae	BK-Virus	SV40 (Simian Virus 40)
	JC-Virus	Rinder-Polyomavirus
	KI-Virus	HaPV (Hamster-Papovavirus)
	WU-Virus	Polyomavirus der Maus
	Merkelzell-Virus	
B-lymphotropes Polyomavirus der Meerkatzen		

1.2 Struktur der Polyomaviren

Polyomaviren sind nicht umhüllte, im Durchmesser 40 – 45 nm große Partikel, deren Capside aus drei Capsidproteinen, dem VP1, VP2 und VP3, bestehen. Das Capsid besteht aus 72 Pentameren, von denen jedes fünf VP1 und jeweils ein VP2 und VP3 Molekül enthält (8). Das VP1 Molekül wird als einziges auf der Oberfläche der Capside präsentiert (8). Das BK- und JC-Virus haben im Gegensatz zu den übrigen Polyomaviren die Fähigkeit zur Hämagglutination (4). Das Genom der Polyomaviren ist im Inneren der ikosaedrischen Capside enthalten (4).

1.3 Genom der Polyomaviren

Das Genom der Polyomaviren ist kovalent geschlossen und somit zirkulär. Es besteht aus doppelsträngiger Desoxyribonukleinsäure (DNS), (englisch: *deoxyribonucleic acid* (DNA)), die eine Länge in Abhängigkeit vom jeweiligen Virus von ca. 5200 Basenpaaren hat (4). Die DNA ist mit vier zellulären Histonen (H2A, H2B, H3 und H4) in Nukleosomenstrukturen assoziiert und liegt als Superhelix vor (4). 70 % der DNA-Sequenzen zwischen SV40 und den BK- und JC-Viren weisen Homologien auf.

Untereinander sind die beiden Viren JCV und BKV zu 75 % identisch (4). Das Genom der Polyomaviren kann in drei Bereiche eingeteilt werden: Die frühe Region kodiert für die Funktionen, die vor Beginn der DNA-Replikation exprimiert werden, die späte Region hingegen kodiert für Funktionen, die erst nach Beginn der DNA-Replikation exprimiert werden (8). Als drittes besitzt die DNA eine Kontroll-Region, auch „*noncoding control region*“ (NCCR) genannt, die den Replikationsursprung sowie die Promotoren für die frühe und späte Region enthalten (8). Die hohe Variabilität dieser Region ist typisch für die Polyomaviren, insbesondere für das JC- und das BK-Virus (8). Jedes Polyomavirus kodiert für zwei frühe mRNAs, die durch alternatives Spleißen entstehen und in das große und kleine T-Antigen translatiert werden (8). Die späten mRNAs kodieren für die drei Capsid-Proteine VP1, VP2 und VP3, sowie für ein viertes Protein namens Agnoprotein (8). Auch diese mRNAs werden alternativ gespleißt (8). Zu beachten ist noch, dass die RNA-Syntheserichtungen für die frühen und späten Transkripte gegenläufig sind, sodass erst der eine und dann der andere DNA-Strang als Matrize dient (4).

1.4 Proteine der Polyomaviren

Die Proteine der Polyomaviren werden in frühe und späte Proteine sowie in Nicht-Strukturproteine unterteilt. Auf die charakteristischen Eigenschaften wird in diesem Kapitel genauer eingegangen. Wenn nicht anders erwähnt, beziehen sich die Ausführungen auf das SV40, da es zu den am besten untersuchten Polyomaviren zählt und damit einen Prototyp dieser Viren darstellt. Die Erkenntnisse, die beim SV40 gewonnen wurden lassen daher Analogieschlüsse beim JCV und BKV zu.

Zu den frühen Proteinen gehören das große T-Antigen, das kleine T-Antigen und bei manchen Polyomaviren noch das mittlere T-Antigen, auf das hier nicht weiter eingegangen wird.

Das große T-Antigen ist ein nukleäres Phosphoprotein mit einer Länge von ca. 700 Aminosäuren (8). Es wird im Cytoplasma synthetisiert (4) und gelangt von dort in den Zellkern, um seine Funktionen auszuüben (8). Um den Kern zu erreichen, benötigt es eine Kernlokalisationssequenz, die als erste dieser Sequenzen für das SV40 charakterisiert wurde (11, 12). Kommt es zu Mutationen in der Kernlokalisationssequenz, so kann der virale lytische Lebenszyklus nicht beendet werden (13). Etwa 5 % des großen T-Antigens

liegen im Cytoplasma oder mit der Zellmembran assoziiert vor (4). Das Protein wird einer Vielzahl von posttranslationalen Modifikationen unterzogen. Es wird phosphoryliert (14), O-glykosoyliert (15), acyliert (16), acetyliert (17) und einer Poly-ADP-Ribosylierung unterzogen (18). Durch die zahlreichen chemischen Modifikationen und die alternativen Spleißvorgänge können die Polyomaviren, obwohl sie eine niedrige Codierungskapazität haben, Proteinvariationen erzeugen, die wiederum unterschiedliche Funktionen haben (4). So bindet sich das große T-Antigen an die virale DNA im Bereich des Replikationsursprungs, ist an der Regulation der Transkription der frühen Gene beteiligt und besitzt eine Helikase und ATPase-Aktivität (4). Das große T-Antigen übernimmt noch weitere Aufgaben, auf die allerdings in dieser Arbeit aufgrund mangelnder Relevanz zum Thema nicht weiter eingegangen wird.

Das kleine T-Antigen hat eine Länge im Bereich von 124 – 194 Aminosäuren (8). Die ersten 82 Aminosäuren des kleinen und großen T-Antigens sind identisch, da ihre RNA-Synthese vom gleichen Promotor gesteuert wird und ihre 5'-Enden somit colinear sind (4). Das Protein wird sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern gefunden (19). Die wichtigste Funktion des kleinen T-Antigens ist die Interaktion mit der Protein Phosphatase 2A (PP2A) (20).

Zu den späten Proteinen gehören die Strukturproteine VP1, VP2 und VP3 und das zu den Nichtstrukturproteinen gehörende Agnoprotein, auf das in dieser Arbeit jedoch nicht weiter eingegangen wird. Die Länge des VP1 beträgt beim SV40 364 Aminosäuren, die des VP2 352 und die des VP3 234 Aminosäuren und unterscheidet sich nur geringfügig bezüglich der Anzahl an Aminosäuren beim JCV und BKV (8). Die Proteine VP2 und VP3 werden von der gleichen mRNA translatiert, was dazu führt, dass VP2 die komplette VP3-Sequenz an seinem C-Terminus enthält (8). Allerdings verwendet das VP2 einen anderen Translationsstart, der an seinem N-Terminus zusätzliche Aminosäuren besitzt (4). Das VP2 wird an seinem N-Terminus einer Myristoylierung unterzogen, die eine wichtige Rolle im frühen viralen Lebenszyklus spielt (21). Zusätzlich besitzen alle Strukturproteine Kernlokalisierungssignale, da sie alle im Zellkern zu Partikeln zusammengesetzt werden (4). Wichtig ist noch, dass neutralisierende Antikörper gegen Epitope des VP1 gerichtet sind (4) und diese Antikörper unter Umständen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der PML spielen (1). In der aktuellen Literatur wurde darüber hinaus gezeigt, dass CD8⁺ T-Zellen auf Epitope der Strukturproteine VP1, VP2 und VP3 reagieren (22).

1.5 Schritte der Replikation

Die Bindung der Polyomaviren an die Zielzellen erfolgt über das virale Strukturprotein VP1 (8). Nachdem frühe Studien an SV40 den „*Major Histocompatibility Complex*“ (MHC) als Zielrezeptor auf der Wirtszelle vermutet haben (23), zeigen aktuellere Studien, dass SV40 stattdessen das Gangliosid GM1 verwenden könnte (24). Das BK-Virus ist in vitro ebenfalls in der Lage, Ganglioside zum Eintritt in die Wirtszelle zu verwenden (25). Außerdem befinden sie sich auf Gewebe, das von BK-Viren infiziert wird (8). Das JC-Virus hingegen verwendet andere Rezeptoren. Es gelangt über Clathrin vermittelte Endozytose in die Zelle und verwendet einen mit Sialinsäure verbundenen α (2,6) Rezeptor und einen 5HT2a Rezeptor (8, 26). Dieser Rezeptor befindet sich auf Gliazellen, die ein Hauptziel des JCV bei der PML darstellen (8). Die Polyomaviren werden dann auf unterschiedlichen Wegen endozytose-vermittelt in die Zelle aufgenommen und gelangen in den Zellkern, um ihr virales Genom freizusetzen (4).

Im Anschluss beginnt die mRNA-Synthese durch die zelluläre RNA-Polymerase II und damit die frühe Transkription der verschiedenen T-Antigene (4). Das große T-Antigen ist dann für den viralen Lebenszyklus von entscheidender Bedeutung. Da die Polyomaviren für gewöhnlich Zellen infizieren, die sich nicht in einem aktiven Replikationszyklus befinden, ist eine Hauptaufgabe des großen T-Antigens, den Eintritt der Wirtszelle in die S-Phase des Zellzyklus zu induzieren (8). Hierfür interagiert es mit den Produkten der Suszeptibilitätsgene des Retinoblastoms (Rb) und seinen Verwandten p107 und p130 (27, 28). Nachdem es phosphoryliert wurde, bindet das große T-Antigen an den Replikationsursprung und wirkt wie eine Helikase, indem es den DNA-Doppelstrang entwindet und zur Bildung einer Replikationsblase beiträgt (4, 8). Hier können die zellulären Proteinkomplexe, bestehend aus einzelstrangbindenden Proteinen, DNA-Primase und DNA-Polymerase α binden (4). Mit der Synthese von RNA-Primern kann die Replikation des Genoms beginnen. Aufgrund der Lesegenauigkeit der verwendeten zellulären DNA-Polymerase α besitzen Polyomaviren eine hohe genetische Stabilität (4). Während der DNA-Replikation beginnt bereits die Initiation der späten Transkription (8). Auch hierbei spielt das große T-Antigen wieder eine wichtige Rolle, indem es die späte Transkription stimuliert (8).

Der Zusammenbau der Polyomaviren beginnt mit der Translokation der Strukturproteine VP1, VP2 und VP3 aus dem Zytoplasma in den Zellkern und dem Zusammenschluss zu

Capsomeren, die den neugebildeten DNA-Doppelstrang in Form von Minichromosomen enthalten (4). Die Akkumulation von VP2 und VP3 scheint ohne das Vorhandensein von VP1 nicht zu funktionieren und lässt darauf schließen, dass die Strukturproteine als Komplex wichtig sind (29, 30). Unter angemessenen Bedingungen können Capsomere, die ausschließlich aus VP1 bestehen, eine Capsidstruktur bilden, die als VLPs bezeichnet werden und weder virale DNA noch VP2 und VP3 enthalten (8). Wie die neu synthetisierten Viren die Zelle verlassen, ist noch Bestandteil der aktuellen Forschung. Es gibt aber Studien, die eine Lyse der Wirtszelle oder ein Verlassen der Zelle ohne Zelluntergang beschreiben (31, 32).

1.6 Die JC- und BK-Viren als pathogene Erreger

Die pathogenetische Bedeutung des JCV und BKV ist für immunkompetente Patienten gering (4). Die Erstinfektion mit BKV kann bei Kindern mit intaktem Immunsystem respiratorische Erkrankungen verursachen (4). Das BK-Virus wurde jedoch auch mit einer limitierten Anzahl an Fällen von Retinitis, Nephritis, Pneumonie und Encephalitis assoziiert oder von diesen Patienten isoliert (33-35). Das BKV wird besonders häufig bei Patienten mit Nierenerkrankungen und Zystitis nach Nieren- und Stammzelltransplantation im Urin der Patienten gefunden (36). Die Infektion mit BKV führt bei immunsupprimierten Patienten zu Tubulusfibrosen und -atrophien, Ureterstenosen und Nierenversagen (37-39).

Das JC-Virus löst bei immunkompetenten Individuen für gewöhnlich keine Erkrankungen aus. Es gibt jedoch Einzelfallberichte von Patienten, die ohne Immundefizit eine PML entwickelt haben (40, 41). Kommt es allerdings zu einer erworbenen oder angeborenen Störung des Immunsystems, kann dies zur Ausbildung einer PML führen (4). Tabelle 2 fasst die wichtigsten Erkrankungen, die durch JCV und BKV verursacht werden, zusammen.

Tabelle 2: Durch BK- und JC-Viren verursachte Krankheiten nach (4)

BK-Virus	JC-Virus
Infekte der Atemwege	Progressive multifokale Leukenzephalopathie (PML) bei immundefizienten Personen
Hämorrhagische Zystitis	JCV-Meningitis (42)
Ureterstenose Zystitis (bei Kindern) (bei Nierentransplantierten)	JCV Körnerzell-Variante des Kleinhirns ((<i>Granule cell neuronopathy</i> (JCV GCN)) (42)
Pankreatitis (sehr selten)	

Die Infektion mit JCV und BKV erfolgt wahrscheinlich nach oraler und inhalativer Übertragung und breitet sich hämatogen aus (4, 8). Für eine hämatogene Ausbreitung spricht, dass beide Viren nicht nur in der Niere und dem Gehirn, sondern auch im Herz, in der Lunge, dem Kolon, der Leber und der Milz gefunden wurden (43, 44). JCV infiziert im Verlauf der Infektion B-Lymphozyten und wahrscheinlich auch weitere Zellen des Blutes, wie T-Zellen, die das Virus transportieren (8, 45). Beide Viren persistieren lebenslang in ihrem Wirt (46). Der primäre Ort der Persistenz sind sowohl beim BKV als auch beim JCV die Nieren (8). Das JC-Virus persistiert zusätzlich in lymphatischen Organen und im Knochenmark (47).

Die Serokonversion scheint beim BK-Virus zwischen dem 5. und 7. Lebensjahr und beim JC-Virus später zu beginnen (46). Antikörper gegen beide Viren verbleiben lebenslang, können aber in der Höhe der Titer variieren (8). Gemessen werden meist IgG-Antikörper, aber bei Einsetzen von klinischen Symptomen einer BKV-Infektion wurde auch eine IgM Antwort identifiziert (48). Bei Patienten nach Nieren- und Knochenmarkstransplantation wurden IgM- und IgA-Antikörper gefunden (49). Die Seroprävalenz liegt laut einer australischen Studie für das BK-Virus in der Gruppe der unter 40-Jährigen bei 99 % und in der Gruppe der über 70-Jährigen bei ca. 93 %, beim JC-Virus bei 58 % in der Gruppe der unter 40-Jährigen und bei ca. 64 % in der Gruppe der Menschen über 70 Jahre (50). Eine weitere Studie von Warnke et al. kam zu einer etwas geringeren Durchseuchung mit BKV und zu ähnlichen Ergebnissen beim JCV (51). Andere Arbeiten führten zu ähnlichen Ergebnissen (52, 53). Da es jedoch keinen Bestätigungstest gibt und somit falsch positive oder negative Ergebnisse nicht sicher ausgeschlossen werden können, ist die wahre Seroprävalenz in der Bevölkerung nicht sicher zu bestimmen. So wurde der

StratifyJCV® Test der Firma Biogen an Patienten validiert, die JCV im Urin ausschieden und somit als positiv galten (53). Des Weiteren unterscheiden sich die verwendeten Testmethoden. Zum einen werden ELISA verwendet, die wie in der vorliegenden Arbeit rekombinant bakteriell exprimiertes VP1 nutzen, zum anderen werden auch *virus-like-particle* (VLP) erzeugt und in einem ELISA verwendet (54).

Die zelluläre Immunantwort von mit JCV und BKV infizierten Patienten wird von CD8+ zytotoxischen T-Zellen vermittelt, die Epitope des VP1 und des großen T-Antigens erkennen (8). Allerdings ist es vor einigen Jahren gelungen, auch eine wichtige Beteiligung von CD4+ T-Zellen bei der Kontrolle einer JCV-Infektion nachzuweisen (55). Ein Epitop auf dem VP1 des BKV löst eine T-Zell-Antwort aus, die auch ein VP1 Epitop des JCV erkennt (56). Studien konnten zeigen, dass diese Epitope der humanen Polyomaviren kreuzreaktiv sind (57, 58). Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass eine T-Zell-Antwort, die durch Peptide des T-Antigens des BK-Virus ausgelöst wird, durch Kreuzreaktionen ebenfalls zu einer Immunantwort beim JCV führt (59).

1.7 Progressive multifokale Leukenzephalopathie (PML)

Die PML ist eine demyelinisierende Erkrankung, die durch eine von JC-Viren verursachte lytische Infektion, welche hauptsächlich Oligodendrozyten betrifft, ausgelöst wird (60). Allerdings gibt es auch Varianten, bei denen Neurone infiziert werden. Hierzu gehört die JCV-Körnerzell-Variante, bei der die Körnerzellen des Kleinhirns vom JCV infiziert werden (42). Die PML wurde zuerst bei Patienten mit einer chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) und bei Morbus-Hodgkin-Patienten beschrieben (61) und betrifft überwiegend Patienten, die an einem Immundefekt leiden. Hierzu gehören beispielsweise HIV-Patienten oder Patienten, die unter einer immunsuppressiven Therapie stehen (62) (siehe Tabelle 3). Wie bereits 1958 beschrieben, formen die demyelinisierten Bereiche multifokale Läsionen, die vergrößerte, hyperchromatische Oligodendrozyten, Makrophagen und Astrozyten zeigen (61). Die Läsionen können mittels Magnetresonanztomographie (MRT) betrachtet werden und betreffen hauptsächlich die beiden Hemisphären des Gehirns sowie das Kleinhirn (63). Die Infektion ist jedoch nicht auf die weiße Substanz beschränkt. Sie kann ebenfalls die graue Substanz, meningeale Zellen sowie Zellen des Plexus Choroideus betreffen (42). Des Weiteren sind sie typischerweise an der Verbindungsstelle zwischen grauer und weißer Substanz lokalisiert, an der es den höchsten zerebralen Blutfluss gibt. Dies deutet darauf hin, dass

das JC-Virus über einen hämatogenen Weg in das Gehirn gelangt (8). Die Diagnose wird anhand von typischen Auffälligkeiten im MRT oder den Nachweis von JCV-DNA im Liquor gestellt. Im Falle einer negativen PCR und dem begründeten Verdacht einer PML kann zusätzlich eine Hirnbiopsie aus den verdächtigen Bereichen entnommen werden (64).

Klinisch zeigen Patienten mit einer PML neurologische Symptome wie Muskelschwäche, Gangstörungen, kognitive Störungen, Sprachstörungen, sowie sensorische und visuelle Einschränkungen (64). Bei AIDS-Patienten besteht eine starke Korrelation zwischen einer längeren Überlebenszeit und der Höhe an absoluten CD4/CD8 Zellen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung (65).

Tabelle 3: Therapieinduzierte Fälle von Progressiver Multifokaler Leukenzephalopathie (66, 67)

Die Daten basieren auf Meldungen (01.01.2004 – 30.09.2010) des *US Adverse Event Reporting System* (AERS) (68) und Mitteilungen von pharmazeutischen Unternehmen. * = häufig in Kombinationstherapie

Medikation	Eingesetzt für/gegen	Anzahl der Fälle	Referenzen
Azathioprin	Transplantation, Autoimmunerkrankung	7	
Cyclosporin	Transplantation	13	
Cyclophosphamid	Onkologie, Transplantation, Autoimmunerkrankung	13	
Dimethylfumarat (z. B: Tefidera, Fumaderm und weitere)	Multiple Sklerose, Psoriasis	4	(67)
Efalizumab	Autoimmunerkrankung (Psoriasis)	12	
Fingolimod	Multiple Sklerose	9	(67)
Infliximab	Autoimmunerkrankung	11*	
Leflunomid	Autoimmunerkrankung	3	
Methotrexat	Onkologie, Autoimmunerkrankung	12*	
Mycophenolat	Transplantation, Autoimmunerkrankung	23	
Natalizumab	Autoimmunerkrankung	667	(67)
Rituximab	Onkologie, Autoimmunerkrankung	124	
Tracrolimus	Transplantation	14	

1.7.1 Der humanisierte, monoklonale Antikörper Natalizumab (Tysabri[®])

Bei Natalizumab handelt es sich um einen Anti- α 4-Integrin-Antikörper, der T-Zellen daran hindert, an den VLA-4 Rezeptor („*Very Late Antigen-4*“), der sich auf endothelialen Zellen befindet, zu binden (8). Er reduziert damit die Fähigkeit der Leukozyten, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden (69, 70). Er wird zur Behandlung der schubförmig verlaufenden Multiplen Sklerose (MS) eingesetzt. Unter der Behandlung mit Natalizumab liegt das über die Zeit kumulierende Risiko, das unter anderem von einer vorherigen Therapie mit anderen immunsuppressiven Medikamenten abhängig ist, eine

PML zu entwickeln bei $\geq 1:100$ (67). Ein Großteil der in dieser Arbeit verwendeten Serum- und Liquorproben stammt von Patienten, die unter einer Therapie mit Natalizumab stehen bzw. standen.

1.7.2 Risikostratifizierung mittels JCV-Serologie

Die Serum- und Liquor-Proben, die in dieser Arbeit verwendet wurden, stammen zum größten Teil von MS- Patienten, die mit Natalizumab therapiert werden. In den letzten Jahren wurden Serum-/Liquorproben von einzelnen Patienten und zusätzlich sequentielle Untersuchungsmaterialien von Patienten, die mehrfach lumbalpunktiert wurden, im Institut für Virologie des Universitätsklinikums Düsseldorf (UKD) untersucht und anschließend archiviert. Es existieren bereits Vordaten zu JCV- und BKV-IgG-Bestimmungen aus beiden Materialien. Dabei gab es Hinweise darauf, dass die JCV-Antikörperkonzentrationen bei Patienten im zeitlichen Verlauf mengenmäßig im Serum und im Liquor ansteigen und dass es bei einigen sequenziell vorhandenen Proben im Serum und im Liquor parallel zu einem JCV- und ebenfalls zu einem BKV-Antikörper Anstieg kommt.

Der JCV-Antikörper-Anstieg kann in Analogie zu anderen Virusinfektionen als Zeichen einer aktiven JCV-Infektion bzw. PML interpretiert werden, kann aber meist erst nach dem Zeitpunkt der klinischen Diagnosestellung nachgewiesen werden (71). Ein weiterer Risikofaktor für die Entstehung einer PML bei Patienten unter Natalizumab-Therapie ist die Höhe von Anti-JCV-Antikörper-Indices, die von der Firma Biogen, mit Hilfe eines ELISAs (StratifyJCV®), eingeführt wurden. Patienten mit einem hohen Anti-JCV-Antikörper-Index haben, im Vergleich zu denen mit einem niedrigen Index, ein höheres Risiko eine PML zu entwickeln (72). Der Test wird daher als Risikomarker im Vorfeld einer Therapie mit Natalizumab eingesetzt. Auch das Vorhandensein und Nichtvorhandensein bestimmter HLA Typen könnte ein möglicher Risikofaktor bei der Etablierung einer PML sein (73).

1.7.3 Pathogenese der Progressiven Multifokalen Leukenzephalopathie

Die Primärinfektion mit JCV erfolgt wahrscheinlich über eine Infektion der Stromazellen der Tonsillen (8). Allerdings gibt es auch Hinweise auf eine Infektion des Respirationstraktes nach Inhalation des Virus (8). Das JC-Virus führt zu einer subakuten oder asymptomatischen Infektion, die vom Immunsystem kontrolliert und beseitigt wird

(8). Das Virus persistiert dann in mehreren Organen (siehe 1.6). Während dieser Zeit kann es zu Mutationen in der NCCR und der VP1-Region kommen (47). In der NCCR wurden Rearrangements, Deletionen und Duplikationen (74) und in der VP1-Region Aminosäureaustausche in der Rezeptorbindungsregion (75) gefunden. Diese Mutationen sind stark mit der Entwicklung eines Neurotropismus und der PML assoziiert und entwickeln sich wahrscheinlich viele Monate oder Jahre vor der Entstehung der PML (47). Arbeiten von Jelcic et al zeigen Hinweise darauf, dass die Mutationen im VP1 zu einer reduzierten CD4+ T-Zellantwort gegen bestimmte JCV Varianten führen (22). Ebenfalls diskutiert werden „Antikörper-blind-spots“ für die PML-Mutationen im VP1, die bei einer geringen Anzahl von gesunden Individuen gefunden wurden (76). Die JCV-PML-Mutanten im ZNS könnten der Immunantwort über einen Escape-Mechanismus entgehen (76).

Die genauen Mechanismen, die zu einer PML unter einer Therapie mit Natalizumab führen, bleiben unbekannt, auch wenn es zweifellos die Immunüberwachung im zentralen Nervensystem (ZNS) herabsetzt und es Hinweise auf eine Mobilisation von Zellen aus dem Knochenmark, die das JC-Virus tragen, gibt (47, 77). Dauert die Immunsuppression aufgrund eines erworbenen oder angeborenen Defekts weiter an, kann es zur Manifestation einer PML kommen.

1.7.4 Therapie der Progressiven Multifokalen Leukenzephalopathie

Die Therapie der PML gestaltet sich bis heute schwierig. Die intravenöse und intrathekale Gabe von Cytarabin führte einigen Berichten zufolge bei AIDS-Patienten zu einer Remission der PML-Symptome bzw. in einigen Fällen konnte das JC-Virus im Liquor mit Hilfe einer PCR nicht mehr nachgewiesen werden (78, 79). Eine größere Studie konnte allerdings keine klinische Verbesserung bei PML-Patienten, die unter Cytarabin Therapie standen, feststellen (80). Des Weiteren wurden Therapien mit Cidofovir und Interferon- α durchgeführt, die eine geringe Verzögerung der Progression der PML zur Folge hatten (8). Zur Behandlung der PML bei MS-Patienten unter Natalizumab-Therapie wird häufig eine Apherese angewandt, um das schädigende Agens aus dem Blut zu entfernen. Jedoch gibt es auch hier Anzeichen, dass diese Therapie zu keiner Verbesserung des Überlebens oder des klinischen Ergebnisses führt (81).

Bis heute ist weder einer Impfung gegen das JC-Virus noch eine kausale Therapie gegen die PML bekannt. Zu diesem Schluss kamen auch Pavlovic et al (82) sowie Warnke et al. (83).

Nach abruptem Absetzen einer immunsuppressiven Therapie kann es, nachdem es primär zu einer klinischen Besserung des Patienten kommt, sekundär zum sogenannten *immune reconstitution inflammatory syndrome* (IRIS) kommen. Das IRIS ist das Ergebnis einer übermäßigen Entzündungsreaktion nach Immunrestitution auf zuvor diagnostizierte oder noch unbekannte opportunistische Pathogene (im Falle der PML-IRIS auf das JC-Virus) (84). Es wurden eine Vielzahl von Manifestationen beschrieben (84). Die Therapie erfolgt mit hochdosierten Steroiden (82) oder mit dem Chemokin-Rezeptor-5-Blocker (CCR5-Blocker) Maraviroc, da CCR5+ T-Zellen eine Rolle bei der Pathophysiologie des IRIS spielen (85).

1.8 Diagnostik

Eine besondere Bedeutung für die Diagnosestellung einer PML kommt dem Nachweis der JCV-DNA im Liquor mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zu (86-88). Dabei liegt die Sensitivität der Methodik zwischen 60 % und 90 % und die Spezifität wird mit fast 100 % angegeben (86, 87). Eine Erhöhung der Sensitivität kann durch den JCV-DNA-Nachweis aus einer Hirnbiopsie erreicht werden, die höher ist als der Nachweis im Liquor (89, 90).

Zum serologischen Nachweis des JC- und BK-Virus-Antikörpers wurden *Enzyme-linked Immunosorbent Assays* (ELISA) entwickelt, die das virale Strukturprotein VP1, andere virale Proteine oder VLPs als Antigen verwenden (91). Allerdings ist der serologische Nachweis einer JCV-Infektion bisher nur an wenigen Zentren verfügbar. Daher wurde am Institut für Virologie der Universität Düsseldorf auf Grundlage eines ELISAs, der am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg entwickelt wurde, ein serologischer Nachweis von JCV- und BKV-VP1 Antikörpern etabliert. Die Expressionsplasmide wurden uns freundlicherweise vom DKFZ zur Verfügung gestellt (92, 93). Als Antigen dient dabei ein rekombinant exprimiertes Polyomavirus-VP1-Fusionsprotein, an das Glutathion-S-Transferase gekoppelt ist, welches über eine Glutathion-Casein Brücke an die Festphase des ELISAs gebunden ist. Durch eine Voradsorption mit dem heterologen, löslichen VP1 aller Seren sollten Kreuzreaktionen

soweit es geht reduziert werden. Der ELISA zeigt eine hohe Spezifität und auch eine hohe Sensitivität. Allerdings fehlt in der JCV- und BKV-Serologie bis heute ein Goldstandard und es gibt weiter Diskrepanzen bezüglich der Interpretation im unteren Messbereich, da eine Grauzone nicht klar definiert ist. Der in dieser Arbeit verwendete ELISA wurde bereits einer Cross-Validation mit dem von der Firma Biogen eingesetzten StratifyJCV®-ELISA unterzogen (51). Diese ergab eine gute Übereinstimmung für den JCV-Antikörper-Status sowie eine starke Korrelation für die Antikörper-Reaktivität bei JCV positiven Patienten (51).

1.9 Mögliche Interferenzen zwischen BKV- und JCV-Infektionen

Bei der Untersuchung der Seroprävalenz zwischen dem JCV und dem BKV konnte in mehreren Studien ein Zusammenhang zwischen den beiden Polyomaviren gezeigt werden. So konnten Knowles, W.A. et al bei Patienten < 40 Jahre zeigen, dass in der Gruppe der BKV-seropositiven 25 % auch JCV-seropositiv, in der Gruppe der BKV-seronegativen jedoch fast 53 % seropositiv für das JC-Virus waren (94). Eine weitere Studie führte zu dem Ergebnis, dass BKV-seropositive Individuen seltener JCV im Urin auszuscheiden scheinen als BKV-seronegative (95). Auch andere Studien konnten den Zusammenhang der Seroprävalenz zwischen dem JCV und BKV nachweisen: BKV-positive Patienten zeigen signifikant niedrigere Seroprävalenzen gegen JCV als BKV-negative Patienten (46, 51, 96). Weitere Vorarbeiten, die am Institut für Virologie in Düsseldorf gemacht wurden, ergeben Hinweise darauf, dass Patienten mit manifester PML eine geringere Seroprävalenz mit BKV aufweisen, was weiter auf eine mögliche Interferenz der beiden Polyomaviren im Wirtsorganismus hindeutet (51, 96).

1.10 Zielsetzung

Das JC-Virus ist in den letzten Jahren nach Auftreten von PML-Fällen bei Patienten, die unter einer Therapie mit modernen Immuntherapeutika stehen, wieder verstärkt in den wissenschaftlichen Fokus gekommen. Besonders Patienten, die mit Rituximab (hier haben Patienten, bei denen Rituximab in der Tumorthherapie eingesetzt wird, das größte Risiko) oder Natalizumab therapiert werden, haben ein erhöhtes Risiko, eine PML zu entwickeln. In unserem Kollektiv fanden sich mit der Manifestation der PML deutliche JCV-Antikörperanstiege und bei einigen Patienten zusätzlich BKV-Serokonversionen. Dies könnte als Ursache aber auch Kreuzreaktion zwischen den beiden Polyomaviren haben, die BKV-Serokonversionen vortäuschen. Des Weiteren tauchte die Frage auf, ob über das Gesamtkollektiv gesehen die BKV-Seroprävalenz im PML-Kollektiv niedriger ist als im Kontrollkollektiv, was auf der oben genannten möglichen Interferenz dieser beiden Viren beruhen könnte.

Die Ziele dieser Arbeit sind es, die Wertigkeit der quantitativen Bestimmung der humoralen Immunantwort im Serum gegen das JCV und das BKV bei Patienten mit Manifestation einer PML systematisch bei definierten Kollektiven zu untersuchen und die Frage zu klären, ob es messbare Unterschiede in der Höhe der JCV-Antikörper zwischen PML-Patienten und einem Vergleichskollektiv gibt. In einer weiteren Fragestellung soll ein möglicher Zusammenhang zwischen den Prävalenzen bzw. Antikörper-Aktivitäten gegen das JCV und dem verwandten BK-Virus bei diesen Patienten untersucht werden, um damit Hinweise auf Kreuzreaktionen oder Kreuzprotektionen zwischen den beiden Polyomaviren zu bekommen. Methodisch liegt dabei das Bemühen auf einer Minimierung von inter- und intra-assay Varianzen, die die o. g. Ergebnisse beeinflussen könnten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Materialien arbeitsplatzübergreifend

- Sterile Einmalpipetten
 - 1 ml Pipettiervolumen, Cat. No. 604181, Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
 - 2 ml Pipettiervolumen, Cat. No. 4486, Costar, Corning, USA
 - 5 ml Pipettiervolumen, Cat. No. 4487, Costar, Corning, USA
 - 10 ml Pipettiervolumen, Cat. No. 4488, Costar, Corning, USA
 - 25 ml Pipettiervolumen, Cat. No. 4489, Costar, Corning, USA
- Einkanalpipetten
 - Gilson Pipetman, Frankreich
- Einkanalpipetten
 - Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Pipettenspitzen
 - 0,1-10 µl Bevelled Filter Tips, Cat. No. S1121-3810, TipOne Filter Tip, Starlab-GmbH, Ahrensburg, Deutschland
 - 1-20 µl Bevelled Filter Tips, Cat. No. S1120-1810, TipOne Filter Tip, Starlab-GmbH, Ahrensburg, Deutschland
 - 1-200 µl Bevelled Filter Tips, Cat. No. S1120-8810, TipOne Filter Tip, Starlab-GmbH, Ahrensburg, Deutschland
 - 101-1000 µl Bevelled Filter Tips, Cat. No. S1122-1830, TipOne Filter Tip, Starlab-GmbH, Ahrensburg, Deutschland
- 1,5 ml-Reaktionsgefäße
 - Safe Seal Micro Tubes, Cat. No.72.706.400, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
- 2,0 ml-Reaktionsgefäße
 - Safe-Lock-Tubes, Cat. No. 0030120.094, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Parafilm „M“-Laboratory Film
 - Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA

- Faltenfilter
 - Ø240 mm, 595/ ½, Cat. No. 10311651, Whatman GmbH, Dassel, Deutschland
- Zentrifugenröhrchen
 - 15 ml Gefäß, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
 - 50 ml Gefäß, Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland
 - Polyallomer-tubes 25x89 mm, Cat. No. 326823, Beckmann, Krefeld, Deutschland
- ELISA-Platten
 - U96 MaxiSorp Nunc-Immuno-Plate, Cat. No. 449824, Nunc, Dänemark
- Reaktionssäulen
 - PD10 column, Cat. No. 17-0851-01, Amersham BioSciences, Little Chalfont, Vereinigtes Königreich

2.1.2 Enzyme

- Roche Inhibitor Cocktail Complete 25x, Cat. No. 11 697 498 001, Roche, Basel, Schweiz

2.1.3 Antikörper

- Anti-Human IgG Peroxidase, Cat. No. A0293-1ML, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Humanes Immunglobulin, Ig Privigen, CSL Behring GmbH, Hattersheim, Deutschland

2.1.4 Kits

- Plasmid Maxi Kit (25)
 - Cat. No. 12163, Qiagen, Hilden, Deutschland

2.1.5 Software

- EndNote X7
- GraphPad PRISM 5
- Englische Übersetzung der Zusammenfassung durch <https://www.deepl.com/translator>

2.1.6 Geräte

Vortexer

- VV3, VWR, Darmstadt, Deutschland
- VIBROFIX VF1 Electronic, Janke&Kunkel, IKA Labortechnik, Littau, Schweiz
- Thermomixer comfort
 - Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Gelkammer
 - Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Power Supply
 - Consort E122, Consort, Turnhout, Belgien
- Kolbenschüttler
 - Stuart, Asbach, Deutschland
 - Inkubator Shaker Model G25, New Brunswick Scientific Co., Inc. Edison, USA
- Photometer
 - Sunrise, Tecan, Crailsheim, Deutschland
 - UV Mini 1240, UV-VIS Spectrophotometer, Shimadzu, Kyōto, Japan
- Zentrifugen
 - Centrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
 - Beckmann Avanti J-E, Coulter, Krefeld, Deutschland
 - Beckmann Optima L70K Ultracentrifuge, Krefeld, Deutschland
- Ultraschallbad
 - Sonifier 450, Branson, Dietzenbach, Deutschland
- Waagen
 - Feinwaage, MC 210 S, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
 - Mettler PC 2000, Mettler-GmbH, Gießen, Deutschland

- Pipettierhilfe
 - Pipetboy acu, IBS Integra Biosciences, Chur, Schweiz
- Magnetrührer
 - IKAMAG RH, Janke&Kunkel, IKA Labortechnik, Littau, Schweiz

2.1.7 Chemikalien, Medien und Lösungen

Sofern nicht anders angegeben, wurden Chemikalien der Firmen Merck, Roth, Serva und Sigma verwendet. Die Zusammensetzungen der Medien und Lösungen sind im jeweiligen Versuchsprotokoll angegeben oder in gängigen Lehrbüchern aufgeführt (97, 98)

2.1.8 Escherichia coli Stämme

Für die Transformation und Amplifizierung der Plasmid-DNA wurde der *E. coli* Stamm BL21 (GE Healthcare) eingesetzt.

2.1.9 Rekombinante Plasmide

Die verwendeten Plasmide, pGEX-JCV, pGEX-BKV, pMAL-JCV und pMAL-BKV, wurden freundlicherweise von Herrn Dr. rer. nat. Tim Waterboer, DKFZ, Heidelberg, zur Verfügung gestellt. Abbildung 1 und Abbildung 2 zeigen jeweils ein Beispiel des verwendeten Vektors pGEX und pMAL.

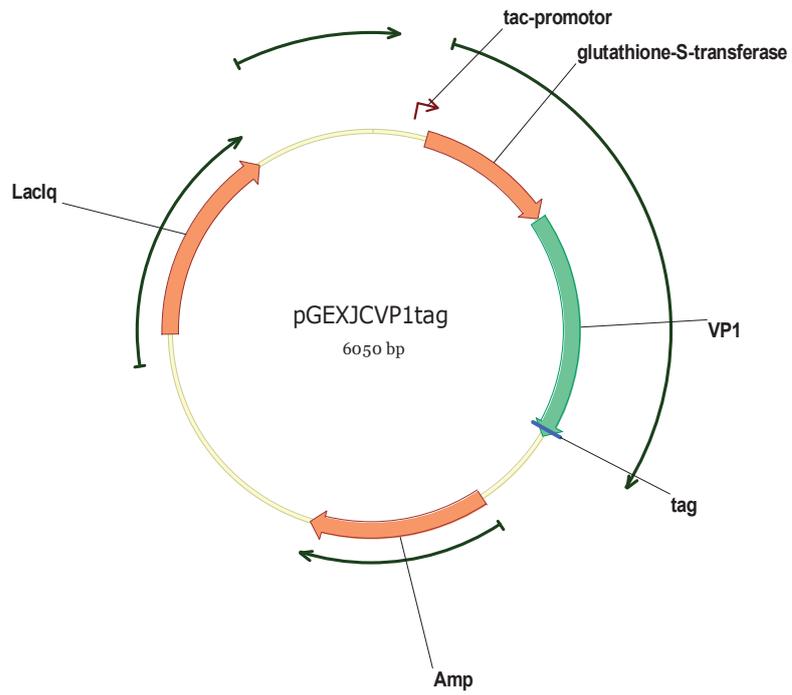


Abbildung 1: pGEX-Plasmid.

Hier beispielhaft das Plasmid pGEX-JCV1.

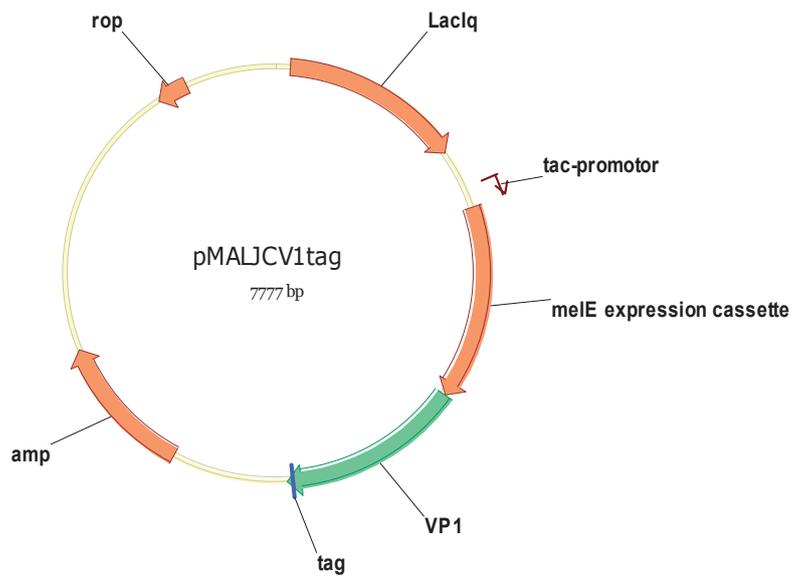


Abbildung 2: pMAL-Plasmid.

Hier beispielhaft das Plasmid pMAL-JCV1

2.2 Methoden

2.2.1 Transformation kompetenter *E. coli* Bakterien mit Plasmid-DNA

Die verwendeten Plasmide wurden auf Filterpapieren vom DKFZ geliefert. Für die folgenden Transformationen der kompetenten *E. coli* Bakterien wurde das Filterpapier mit den entsprechenden Plasmiden in 200 µl Minimal-Tris-EDTA (Min-TE) aufgenommen und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Transformation wurden kompetente *E. coli* Zellen des Stammes BL21 (GE Healthcare, Little Chalfont, Vereinigtes Königreich) verwendet. 50 µl Bakteriensuspension wurden 10 min auf Eis aufgetaut und nach Zugabe von 2 µl der gelösten und 1:100 verdünnten Plasmide 10 min auf Eis gehalten. Nach einem 90-sekündigen Hitzeschock bei 42°C im Thermomixer comfort (Eppendorf) wurden die Zellen erneut 90 sec auf Eis inkubiert und danach in 800 µl LB-Medium (LB: lysogeny broth, Invitrogen, 20 µl 1 M Glucose und 5 µl 2 M Magnesiumchlorid (MgCl₂)) aufgenommen und für 1 h bei 37°C unter Schütteln (220 rpm) inkubiert. Die neu erworbenen Resistenzgene konnten in dieser Zeit exprimiert werden. 300 µl der Bakteriensuspension wurden auf LB/Amp-Platten (LB: lysogeny broth, Invitrogen; Agar: 15 g/l, DIFCO Bitek; Amp: Ampicillin 100 µl/ml, Roche Molecular Biochemicals) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutraum inkubiert.

2.2.2 Herstellung einer Vorkultur mit transformierten *E. coli* Bakterien

Die zuvor über Nacht auf LB/Amp-Platten (LB: lysogeny broth, Invitrogen; Agar: 15 g/l, DIFCO Bitek; Amp: Ampicillin 100 µl/ml, Roche Molecular Biochemicals) gewachsenen Kolonien der *E. coli* Bakterien wurden einzeln über Nacht bei 37°C und 200 rpm in 3 ml LB/Amp-Medium (LB: lysogeny broth, Invitrogen; Amp: Ampicillin 100 µl/ml, Roche Molecular Biochemicals) kultiviert.

2.2.3 Präparative Plasmid-Isolierung („Maxi-Präp“)

Durch diese Methode können große Mengen an Plasmid-DNA mit Hilfe des Plasmid Maxi Kit (Qiagen) isoliert werden. Die Aufreinigung erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Hierfür wurden 150 ml LB-Medium (LB: lysogeny broth, Invitrogen), versetzt mit 150 µl Ampicillin (100 µg/ml Roche Molecular Biochemicals), mit 100 µl einer Vorkultur angeimpft und für 12-16 h bei 37°C und 300 rpm inkubiert. Danach wurde die Bakteriensuspension bei 4°C für 15 min bei 6000 rpm (Beckmann JS-21, JA10/14 Rotor) zentrifugiert. Das entstandene Bakterienpellet wurde in 10 ml kaltem

Puffer P 1 (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM EDTA; 400 µg/ml RNase A; 280 µl/280 ml Lysis-Blue) resuspendiert. Es folgte die Zugabe von 10 ml Puffer P 2 (0,2 M NaOH; 1 % SDS) gefolgt von einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 ml kaltem Puffer P 3 (3 M KAc, pH 5,5) gestoppt und für 20 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde der Ansatz für 30 min bei 4°C und 12000 rpm (Beckmann JS-21, JA10/14 Rotor) zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich die Plasmid-DNA befand, wurde mittels eines Faltenfilters (Ø240 mm, 595/ ½, Whatman GmbH, Dassel, Deutschland) filtriert. Anschließend wurde das Filtrat auf eine vorher mit 10 ml Puffer QBT (750 mM NaCl; 50 mM MOPS pH 7,0; 15 % Isopropanol (v/v); 0,15 Triton X-100 (v/v)) equilibrierte Säule gegeben. Die Plasmid-DNA war jetzt fest an die Säule gebunden und wurde danach zweimal mit 30 ml Puffer QC (1 M NaCl; 50 mM MOPS pH 7,0; 15 % Isopropanol (v/v)) gewaschen, bevor sie durch Zugabe von 15 ml Puffer (QF 1,25 M NaCl; 50 mM Tris Cl pH 8,5; 15% Isopropanol (v/v)) in ein 25 ml Zentrifugenröhrchen eluiert wurde. Das Eluat wurde mit dem 0,7-fachen Volumen Isopropanol präzipitiert und für 30 min bei 4°C und 10000 rpm (Beckmann JS-21, JA13-1 Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das DNA-Pellet mit 5 ml 70 % Ethanol gewaschen und für 10 min bei 4°C und 10000 rpm (Beckmann JS-21, JA13-1 Rotor) zentrifugiert. Nachdem der Überstand erneut verworfen wurde und das Pellet getrocknet war, wurde es in 100-200 µl Minimal Tris-EDTA (Min-TE) aufgenommen und die Konzentration bei einer optischen Dichte (OD) von 260 nm photometrisch (Photometer, Sunrise, Tecan) bestimmt. Die DNA-Konzentration wurde auf 1 µg/µl eingestellt. Die Qualität der Präparation wurde durch Restriktion und anschließende Agarose-Gel-Elektrophorese überprüft.

2.2.4 JCV-Antikörper-Messung im ELISA

Die Methodik der Messung der JCV-Antikörper ist mit Modifikationen auf der Grundlage der folgenden Publikationen entnommen: (92, 93, 99)

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

Die Induktion der chemisch kompetenten *E. coli* erfolgte aus einer Vorkultur (100 ml, 37°C, OD₆₀₀ > 2,0) transformierter BL21 *E. coli*. Aus der Vorkultur wurden 15-25 ml zu 150 ml LB/Amp-Medium (LB: lysogeny broth, Invitrogen; Amp: Ampicillin 100 µl/ml, Roche Molecular Biochemicals) gegeben. Die OD₆₀₀ sollte 0,3-0,5 betragen. Nach Zugabe von 0,25 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) (Applichem A1008,

MW 238) (bei 150 ml LB/Amp-Medium 37,5 µl 1M IPTG) erfolgte eine sechsstündige Inkubation im Bakterieneschüttler bei 30°C. Die Bakterien wurden im Anschluss in vier Aliquote zu je 37,5 ml in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und 30 min bei 4000rpm/4°C (Eppendorf 5810 R) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets je Falcon-Röhrchen in 10 ml Lysis Puffer (40 mM Tris pH 8,0; 200 mM NaCl; 2 mM DTT (1,4-Dithiothreitol); 1 mM EDTA; Aqua dest; 25x Roche Protease Inhibitor Cocktail Complete (400 µl/10 ml)) aufgenommen und nachfolgend mit Ultraschall (Branson Sonifier 450, Output control 5,5 = ca. 25 % Leistung = ca. 100 Watt, Timer 10 min, Duty cycle 50 %) lysiert. Der Inhalt der vier Falcon-Röhrchen wurden wieder vereint und nach Zugabe von 2 mM ATP und 5 mM MgCl₂ für 1 h bei RT inkubiert. Die Suspension wurde hiernach in Polyallomertubes (25x89 mm, Beckmann) 30 min bei 30000 g/4°C (Beckmann Otima L70K Ultracentrifuge im SW32Ti Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wurde in 50 % (v/v) Glycerin aufgenommen und nach einer Proteinbestimmung nach Bradford bei -20°C gelagert.

2.2.6 Antigen-Bindung über Glutathion-Casein

150 mg Casein wurden in 25 ml DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) gelöst (= ~ 0,2 mM Cystein; 2,4-3 mM Lysin). Zur Derivatisierung von Casein-Cystein mit N-Ethylmaleimide (NEM) (Pierce) wurden 0,5 ml NEM (0,4 mM) zu der Lösung hinzugefügt und unter kontinuierlichem Rotation bei RT für 15 min inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation von 30 min unter Rotation bei RT nach Zugabe von 50 mg (4,36 mM) Sulfo-SMPB (Sulfosuccinimidyl 4-[p-maleimidophenyl]butyrate) (Pierce). Dieser Schritt diente der Kopplung der Crosslinker an das Casein. Zur Entfernung der Präzipitate folgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 6000 rpm (Eppendorf 5810 R). 2,5 ml des Überstandes wurden auf die vorher mit DPBS equilibrierte PD10 Säule (PD10 column, Amersham) gegeben und der erste Durchlauf verworfen. Nachfolgend wurden 3 ml DPBS auf die Säule gegeben und das Eluat aufgefangen. Die Säule konnte jetzt mit 15 ml DPBS gewaschen und das beschriebene Prozedere mit den nächsten 2,5 ml Überstand wiederholt werden. Am Ende wurde durch diese Aufarbeitung das freie Sulfo-SMPB entfernt. In einem letzten Arbeitsschritt konnte das Glutathion an Casein-MBP gebunden werden. Hierfür wurden 30 ml des Eluats mit 6 ml Glutathionlösung (120 mM Glutathion in PBS; 10 mM EDTA, pH 7.4; 20 mM NaOH) gemischt und 60 min bei RT unter Rotation inkubiert. Zur Entfernung des freien

Glutathions wurde wie zur Entfernung des freien Sulfo-SMPB verfahren. Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.2.7 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA diente dem serologischen Nachweis von Antikörpern gegen JCV und BKV im Serum (Tabelle 4) oder im Serum und im Liquor als parallel Testung (Tabelle 8). Hierfür wurden 96-Well-Platten (ELISA-Platte 1) mit $150\ \mu\text{l}$ Glutathion-Casein in $50\ \text{mM}$ Carbonat Puffer ($1,59\ \text{g Na}_2\text{CO}_3$ (MW 84); $2,93\ \text{g NaHCO}_3$ (MW 40); $1\ \text{l}$ Aqua dest; pH 9,6) ($200\ \text{ng/Well}$) über Nacht bei 4°C beschichtet. Die Konzentration der Glutathion-Casein-Präparation betrug $1,33\ \mu\text{g/ml}$. Am nächsten Tag konnten die 96-Well-Patten mit $180\ \mu\text{l}$ Casein Blockierungspuffer ($0,2\ \text{g Casein}$; $50\ \mu\text{l Tween 20}$; $100\ \text{ml DPBS}$) $1\ \text{h}$ bei 37°C inkubiert werden und danach mit Waschpuffer (DPBS mit $0,5\ \%$ Tween 20) gewaschen, getrocknet und luftdicht bei 4°C gelagert werden. $100\ \mu\text{l}$ des in 2.2.5 hergestellten Proteins, gelöst in Casein Blockierungspuffer ($250\ \mu\text{g/ml}$), wurden auf die 96-Well-Platte gegeben und $1\ \text{h}$ bei 4°C oder über Nacht inkubiert. Im Anschluss wurde eine Vorverdünnungsplatte nach dem Pipettierschema der Tabelle 5 oder Tabelle 9. beschichtet und für $1\ \text{h}$ oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nachfolgend konnte die mit Glutathion-Casein beschichtete ELISA-Patte 1 gewaschen und $1\ \text{h}$ bei RT mit den Patienten-Seren und/oder dem Liquor inkubiert werden (Tabelle 6 und Tabelle 7, Tabelle 10 und Tabelle 11). Danach wurde die Platte drei Mal mit Waschpuffer gewaschen und es erfolgte eine erneute Inkubation mit einem Anti Human IgG Peroxidase Antikörper, (Sigma) (1:20000) für $1\ \text{h}$ bei RT. Die Platten wurden, nach Zugabe von $100\ \mu\text{l}$ Tetramethylbenzidine (BD Bioscience), $8\ \text{min}$ im Dunkeln inkubiert und nachfolgend die Reaktion mit $50\ \mu\text{l}$ Stopplösung ($1\ \text{M H}_2\text{SO}_4$) beendet. Die Platten wurden dann photometrisch gemessen.

Die Antikörper-Aktivität in „Arbitrary Units“ (AU) und der dynamische Bereich des ELISA wurden durch die serielle Verdünnung von humanem Immunglobulin bestimmt. Seren unter $15,5\ \text{AU}$ für Anti-JCV-Antikörper und $31,2\ \text{AU}$ für Anti-BKV-Antikörper wurden als negativ, Seren über $31\ \text{AU}$ für Anti-JCV-Antikörper und $62,5$ für Anti-BKV-Antikörper als positiv angesehen. Befand sich der gemessene Wert der Seren in einem Zwischenbereich ($15,5\ \text{AU}$ bis $31\ \text{AU}$ für JCV und $31,2$ bis $62,5\ \text{AU}$ für BKV), wurden sie in einem zusätzlichen Spezifitätsbestätigungsassay getestet. Seren mit größer $50\ \%$ AU-Reduktion nach Voradsorption mit löslichem homologen VP1 (z. B. JCV-VP1 im

Anti-JCV-Antikörpertest) im Vergleich zur Voradsorption mit löslichem heterologem VP1 (z. B. BKV-VP1 im Anti-JCV-Antikörper-Assay) wurden dann als positiv gewertet (51).

Tabelle 4: Belegungsschema für den ELLISA:

Spalte 1 enthält die Standards 1-4 (STD1-4), die für die Berechnung der Standardkurve nötig waren. In Spalte 2 kamen die verschiedenen Kontrollen (High-Positive- (HPOS), Medium-Positive- (MPOS), Low-Positive- (LPOS) und Negative-Kontrolle (NEG)). Die Spalten 3-12 (A-D) wurden auf das Vorhandensein von JCV-Antikörpern und die Spalten 3-12 (E-H) auf das von BKV-Antikörpern getestet. Alle Proben wurden 1:60 und 1:180 verdünnt.

	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
	STD2	MPOS	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180
	STD3	LPOS	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60
	STD4	NEG	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180
BKV	STD1	HPOS	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60
	STD2	MPOS	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180
	STD3	LPOS	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60
	STD4	NEG	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180
JCV	STD1	HPOS	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60
	STD2	MPOS	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180
	STD3	LPOS	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60
	STD4	NEG	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180

Tabelle 6: Pipettierschema der ELISA-Platte 1: Zugabe von Casein-Blockierungspuffer:

100 µl Casein-Blockierungspuffer wurden in jedes Well ab Spalte 2 gegeben. Zu Spalte 1 kamen 100 µl der Standards 1-4 (STD1-4).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	STD1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
B	STD2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
C	STD3	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
D	STD4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
E	STD1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
F	STD2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
G	STD3	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
H	STD4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Tabelle 7: Pipettierschema der ELISA-Platte 1: Zugabe von Serum-Vorverdünnung:

Von der Vorverdünnungsplatte wurden dann ab Spalte 2 50 µl in die entsprechenden Spalten 2 der ELISA-Platte 1 gegeben und resuspendiert. 50 µl wurden dann verworfen. Danach wurden ebenfalls 50 µl aus den Spalten 3-12 aus der Vorverdünnungs-Platte entnommen und auf die ELISA-Platte 1 überführt (A, C, E und G) und resuspendiert. Im Anschluss wurden 50 µl Überschuss in B, D, F und H verdünnt und 50 µl verworfen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	STD1	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
B	STD2	50										↓ 50
C	STD3	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
D	STD4	50										↓ 50
E	STD1	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
F	STD2	50										↓ 50
G	STD3	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
H	STD4	50										↓ 50

Tabelle 8: Belegungsschema für den ELISA (Serum/Liquor parallel Testung):

Spalte 1 enthielt die Standards 1-4 (STD1-4), die für die Berechnung der Standardkurve nötig waren. In Spalte 2 kamen die verschiedenen Kontrollen (High-Positive- (HPOS), Medium-Positive- (MOPS), Low-Positive- (LPOS) und Negative-Kontrolle (NEG)). Die Spalten 3-12 (A-D) wurden auf das Vorhandensein von JCV-Antikörpern und die Spalten 3-12 (E-H) auf das von BKV-Antikörpern getestet. Die Spalten 3-12 (A, B, E, F) dienen der Testung im Serum und die Spalten 3-12 (C, D, G, H) der im Liquor. Die Serum-Proben wurden 1:60 und 1:180 und die Liquor-Proben 1:3 und 1:9 verdünnt. S = Serum, L = Liquor

	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
	STD2	MPOS	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180
	STD3	LPOS	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3
	STD4	NEG	1:9	1:9	1:9	1:9	1:9	1:9	1:9	1:9	1:9	1:9
E	STD1	HPOS	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60
	STD2	MPOS	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180	1:180
	STD3	LPOS	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3
	STD4	NEG	1:9	1:9	1:9	1:9	1:9	1:9	1:9	1:9	1:9	1:9
JCV												
BKV												

Tabelle 10: Pipettierschema der ELISA-Platte 1: Zugabe von Casein-Blockierungspuffer (Serum/Liquor parallel Testung):

100 µl Casein-Blockierungspuffer wurden in jedes Well der Spalte 2, sowie der Spalten 3-12 (A, B, D, E, F und H), gegeben. Zu Spalte 1 kamen 100 µl der Standards 1-4 (STD1-4).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	STD1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
B	STD2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
C	STD3	100										
D	STD4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
E	STD1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
F	STD2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
G	STD3	100										
H	STD4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Tabelle 11: Pipettierschema der ELISA-Platte 1: Zugabe von Serum- und Liquor-Verdünnung:

Serumverdünnungen (Zeilen A und E): Von der Vorverdünnungsplatte wurden ab Spalte 2 50 µl in die entsprechenden Spalten 2 der ELISA-Platte 1 gegeben und resuspendiert. 50 µl wurden dann verworfen. Danach wurden ebenfalls 50 µl aus den Spalten 3-12 aus der Vorverdünnungs-Platte entnommen und auf die ELISA-Platte 1 überführt (A und E) und resuspendiert. Im Anschluss wurden 50 µl Überschuss in B und F verdünnt und 50 µl verworfen. Liquorverdünnungen (Zeilen C und G): Es wurden 150 µl aus den Spalten 3-12 aus der Vorverdünnungs-Platte entnommen und auf die ELISA-Platte 1 überführt (C und G). Im Anschluss wurden 50 µl Überschuss in D und H verdünnt und 50 µl verworfen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	STD1	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
B	STD2	50										
C	STD3	50	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150
D	STD4	50										
E	STD1	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
F	STD2	50										
G	STD3	50	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150
H	STD4	50										

2.3 Studiendesign

2.3.1 Ethikvotum

In dieser Arbeit wurden humane Serum- und Liquor-Proben verwendet. Ein Ethikvotum liegt vor:

Referenznummer: Studie 3315 (Prof. Kieseier / PD. Dr. Warnke)

Datum: 06.06.2012

2.3.2 Testung der Proben

Die sequenziellen Materialien eines PML-Patienten werden jeweils in einem Testlauf getestet, um inter-assay Varianzen zu vermeiden. Andererseits wird das große Kollektiv der 67 PML- bzw. 77 Kontrollpatienten zusammengefasst und randomisiert und dann in den dafür nötigen ca. 10-20 Testläufen abgearbeitet. Alle Testungen werden mit einer Charge an eigens dafür hergestellten Reagenzien durchgeführt, um Chargenschwankungen und deren Auswirkung auf die Resultate zu verhindern.

Die genauen Charakteristika der Gesamtgruppe von 144 Patienten ist in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Charakteristika der Gesamtgruppe von 144 Patienten:

p-Wert Alter: *p* = 0,46, nicht signifikant, *p*-Wert Geschlecht: 0,013, signifikant

Charakteristika	Gesamtgruppe	Kontrollgruppe	PML-Gruppe
Anzahl Patienten	144	77	67
Durchschnittsalter	48,5	46	51
Geschlecht n (%)			
Männlich	47	18 (23)	29 (43)
Weiblich	97	59 (77)	38 (57)
Erkrankungen			
Multiple Sklerose	71	29	42
Unter Natalizumab Therapie	57	15	42
Unter Natalizumab und Fumarsäure Therapie	1	1	0
Unter Natalizumab und Fingolimod Therapie	1	1	0
Unter Interferon Therapie	1	1	0
Unter Alemtuzumab Therapie	1	1	0
Unter Fingolimod Therapie	1	1	0
Unter Fumarsäure und Glatirameracetat Therapie	1	1	0
Onkologisch	15	8	7
Unter Rituximab Therapie	5	0	5
HIV	9	2	7
Immundefekt	1	0	1
Psoriasis	1	0	1
Raumforderung li. Hemisphere	1	1	0
Sarkoidose	1	1	0
ZNS Vaskulitis	1	1	0
Fingolimod Therapie mit unbekannter Grunderkrankung	1	1	0
Neuromyelitis unter Rituximab Therapie	1	1	0
Unbekannte Grunderkrankungen	41	33	8
Einsendung der Proben aus einer Neurologie	24	23	1

3 Ergebnisse

Erste Experimente und Auswertungen zu dem Thema dieser Dissertation führten zu interessanten Ergebnissen bezüglich der Verteilung von Antikörpern gegen das JC- und das BK-Virus in unterschiedlichen Patientenkollektiven (siehe 1.9). Um einen „*Detection Bias*“ zu vermeiden und damit für eine Valide Aussage der Ergebnisse zu sorgen, wurde daher in dieser Arbeit besonderer Wert auf eine Randomisierung der verwendeten Proben gelegt.

3.1 Seroprävalenz des JC- und BK-Virus in der PML-Gruppe und in der Kontrollgruppe

Dieser Versuch sollte die in 1.10 gestellten Fragen zur JCV- und BKV-Serologie untersuchen. Zum einen sollte die Frage nach einer möglichen Kreuzprotektion zwischen JCV und BKV geklärt werden und zum anderen die Frage nach einer Kreuzreaktion zwischen den Antikörpern gegen die beiden Polyomaviren. Tabelle 13 zeigt die Ergebnisse der statistischen Auswertung der insgesamt 144 Proben, die in eine Kontrollgruppe und in eine PML-Gruppe unterteilt wurden. Dabei gehörten 77 Patienten der Kontrollgruppe und 67 Patienten der PML-Gruppe an. Bei der PML-Gruppe wurden Seren von Patienten mit einer gesicherten PML untersucht und in der Kontrollgruppe Seren von Patienten, bei denen eine PML zuvor ausgeschlossen wurde.

Tabelle 13: JCV - und BKV – Antikörper Status der Kontrollgruppe und der PML – Gruppe:

Es wurden Seren von 144 Patienten randomisiert untersucht. Hierunter waren 77 Patienten der Kontrollgruppe und 67 Patienten der PML-Gruppe. Die Seren wurden auf Vorhandensein von Antikörpern gegen JCV und BKV untersucht. * = Zwei PML Patienten unter Rituximab Therapie. p für JCV-Antikörper = 0,00048, signifikant, p für BKV-Antikörper = 0,019, signifikant

	Kontrollgruppe (n = 77)		PML-Gruppe (n = 67)	
	Positive (%)	Negative (%)	Positive (%)	Negative (%)
JCV-Antikörper	56 (72,7)	21 (27,3)	63 (94)	4* (6)
BKV-Antikörper	68 (88,3)	9 (11,7)	50 (74,6)	17 (25,4)

In der Kontrollgruppe waren 72,7 % der Patienten JCV seropositiv und 27,3 % JCV seronegativ. Antikörper gegen BKV konnten hier bei 88,3 % der Patienten gefunden werden. Lediglich 11,7 % waren BKV seronegativ. In der PML-Gruppe zeigte sich eine andere Verteilung. Hier waren 94 % der Patienten mit einer gesicherten PML JCV seropositiv und 6 % JCV seronegativ. Hingegen hatten 74,6 % der Patienten Antikörper gegen BKV. Bei 25,4 % konnten diese Antikörper nicht nachgewiesen werden. Der p-Wert für die JCV-Antikörper ist mit 0,00048 wie der der BKV-Antikörper mit 0,019 hoch signifikant.

Nachdem der Serostatus gegen die beiden Polyomaviren JC und BK in den Kohorten untersucht wurde, sollte jetzt die Frage nach der Höhe der Antikörper-Aktivität geprüft werden. Hierfür wurden Arbitrary Units (AU) definiert und für die seropositiven Patienten aus der Kontroll- und der PML-Gruppe berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 dargestellt.

In der Kontrollgruppe beträgt die durchschnittliche Höhe der JCV-Antikörper-Aktivität 137 AU/ml und die der BKV-Antikörper 450,5 AU/ml. Die PML-Gruppe hingegen zeigte mit 446,3 AU/ml einen deutlich höheren Durchschnitt der JCV-Antikörper-Aktivität als in der Kontrollgruppe ($p < 0,0001$). Die durchschnittlichen BKV-Antikörper-Aktivitäten unterschieden sich in der PML-Gruppe hingegen mit 383,1 AU/ml nicht signifikant von der Kontrollgruppe ($p = 0,309$).

Tabelle 14: JCV- und BKV-Antikörper-Aktivität von seropositiven Patienten der Kontrollgruppe und Patienten der PML-Gruppe:

Die Antikörper-Aktivität der seropositiven Patienten der Kontrollgruppe und der PML-Gruppe wurden unter Zuhilfenahme von Arbitrary Units (AU) miteinander verglichen. SE = Standardabweichung, Ø = Durchschnitt. JCV $p < 0,0001$, BKV $p = 0,309$

	Kontrollgruppe -seropositive-				PML-Gruppe -seropositive-			
	n	Ø (AU/ml)	SE	Konfidenzintervall (p = 95 %)	n	Ø (AU/ml)	SE	Konfidenzintervall (p = 95 %)
JCV- Antikörper	56	137	21,9	93,12 - 181	63	446,3	81	284,4 – 608,3
BKV- Antikörper	68	450,5	59,6	181 - 569,4	50	383,1	79,4	223,6 – 542,6

Zur Verdeutlichung der Ergebnisse aus Tabelle 14 wurden diese in Abbildung 3 und Abbildung 4 grafisch dargestellt. Verglichen wurden erneut die seropositiven Patienten aus der Kontroll- und der PML-Gruppe. Die Aktivität der Antikörper wurde in Arbitrary Units (AU) gemessen und miteinander verglichen.

Es zeigte sich, dass die JCV-Antikörper-Aktivität in der PML-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich höher war. Dieses Ergebnis ist mit einem p-Wert von $< 0,0007$ hoch signifikant. Die BKV-Antikörper-Aktivität zeigte jedoch keinen Unterschied zwischen der PML-Gruppe und der Kontrollgruppe.

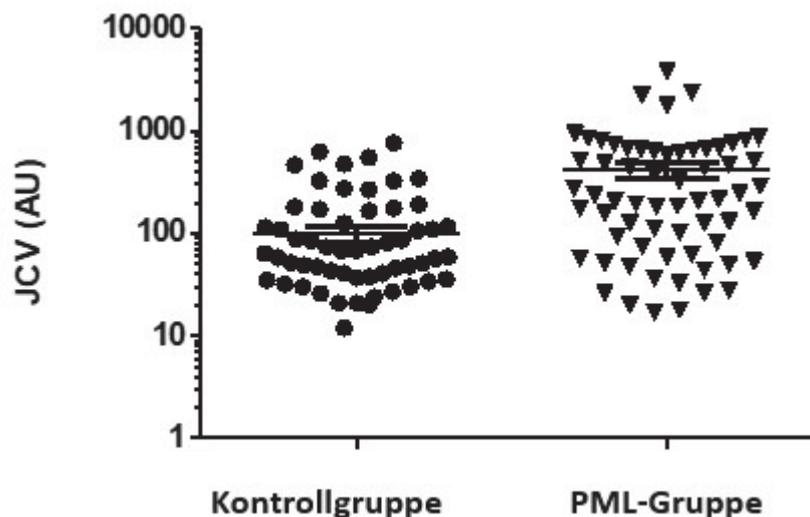


Abbildung 3: JCV-Antikörper-Aktivität von seropositiven Patienten in der PML-Gruppe und der Kontrollgruppe:

Es wurden Seren von 144 Patienten randomisiert untersucht. Hierunter waren 77 Patienten der Kontrollgruppe und 67 Patienten der PML-Gruppe. Die JCV-Antikörper-Aktivität der seropositiven Patienten der Kontrollgruppe und der PML-Gruppe wurden, unter Zuhilfenahme von Arbitrary Units (AU), miteinander verglichen und grafisch dargestellt. 21 Patienten aus der Kontrollgruppe sowie 4 Patienten aus der PML-Gruppe waren negativ und sind daher auf Grund der logarithmischen Skalierung nicht dargestellt. $p = < 0,0007$, signifikant. Horizontale Linien = Mittelwert und Standardabweichung.

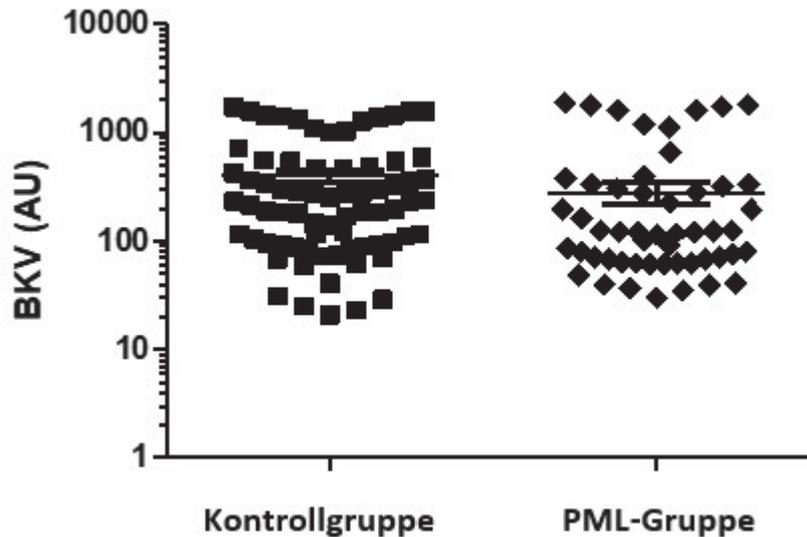


Abbildung 4: BKV-Antikörper-Aktivität von seropositiven Patienten in der PML-Gruppe und der Kontrollgruppe:

Es wurden Seren von 144 Patienten randomisiert untersucht. Hierunter waren 77 Patienten der Kontrollgruppe und 67 Patienten der PML-Gruppe. Die BKV-Antikörper-Aktivität der seropositiven Patienten der Kontrollgruppe und der PML-Gruppe wurden unter Zuhilfenahme von Arbitrary Units (AU) miteinander verglichen und grafisch dargestellt. 5 Patienten aus der Kontrollgruppe sowie 16 Patienten aus der PML-Gruppe waren seronegativ und sind daher auf Grund der logarithmischen Skalierung nicht dargestellt. $p = 0,49$, nicht signifikant. Horizontale Linien = Mittelwert und Standardabweichung.

Im Anschluss wurde die Frage gestellt, was passiert, wenn bei einem einzelnen Patienten die Relation der JCV zu BKV-Antikörper in Beziehung gesetzt wird? Um dieser Frage nachzugehen, wurde der JCV/BKV-Antikörper-Quotient gebildet. Dies erfolgte erneut bei den seropositiven Patienten aus beiden Kohorten. Durch Errechnen des JCV/BKV-Quotienten wird für jeden Patienten individuell das Verhältnis JCV- zu BKV-Antikörpern bestimmt. Hierdurch wird eine bessere Diskriminierung von der PML-Gruppe zur Kontrollgruppe erreicht. Das Ergebnis ist in Abbildung 5 und Abbildung 6 grafisch dargestellt.

Hierbei wird deutlich, dass in der PML-Gruppe Patienten einen JCV/BKV- Quotienten von > 4 erreichten, der in der Kontrollgruppe nicht gefunden werden konnte. Die Ergebnisse aus den beiden Abbildungen sind mit einem p -Wert von $< 0,001$ signifikant.

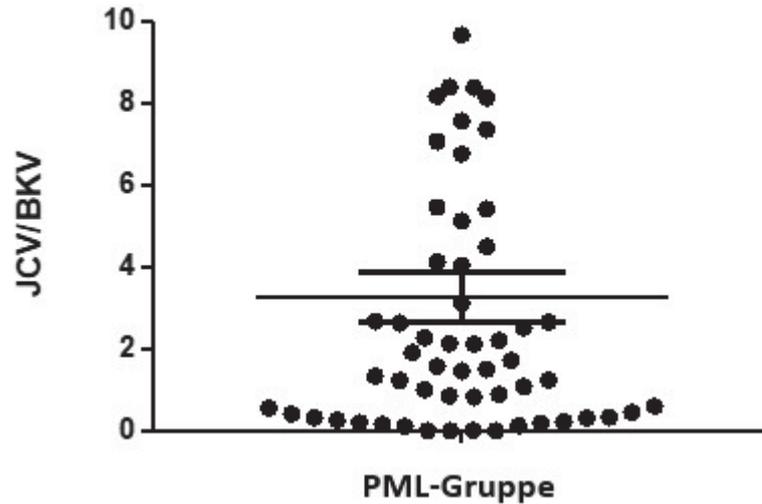


Abbildung 5: JCV/BKV–Antikörper- Quotient von seropositiven Patienten der PML–Gruppe:

Der JCV/BKV–Antikörper–Quotient wurde gebildet und grafisch dargestellt. Der p-Wert liegt zwischen Abbildung 5 und Abbildung 6 bei $p < 0,001$, signifikant. Horizontale Linien = Mittelwert und Standardabweichung.

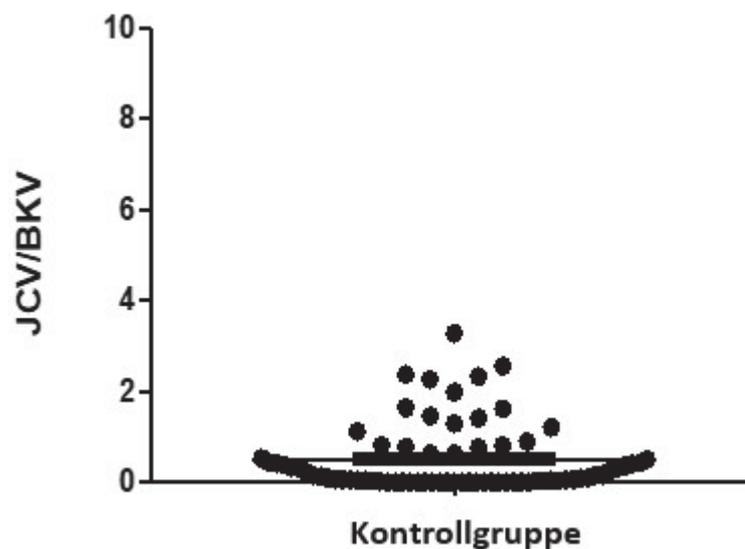


Abbildung 6: JCV/BKV–Antikörper-Quotient von seropositiven Patienten der Kontrollgruppe:

Der JCV/BKV–Antikörper–Quotient wurde berechnet und grafisch dargestellt. Der p-Wert liegt zwischen Abbildung 5 und Abbildung 6 bei $p < 0,001$, signifikant. Horizontale Linien = Mittelwert und Standardabweichung.

Zuletzt sollte geprüft werden, ob eine Vorhersage zum Auftreten einer PML mit den erhobenen Daten gemacht werden kann. Hierfür wurden *Receiver-Operating-Characteristic-Kurven* (ROC–Kurven) angefertigt. Dabei entspricht eine *Area under the curve* von 0,5 einem zufälligen Geschehen, wohingegen eine *Area under the curve* von 1,0 dem Maximum und damit einer Spezifität von 100 % entspricht. Die ROC-Kurve für die JCV-Kontroll- und PML-Gruppe ist in Abbildung 7 dargestellt.

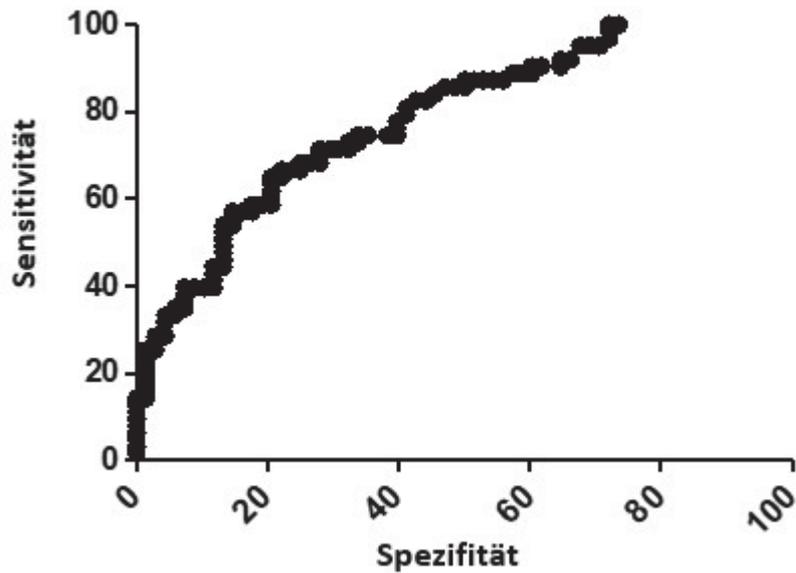


Abbildung 7: ROC-Kurve für die Bestimmung der JCV-Antikörperaktivität zur Wahrscheinlichkeit des Vorliegens einer PML:

Dargestellt ist die Sensitivität auf der Y-Achse und die Spezifität auf der X-Achse. Ab einer JCV-Antikörper-Aktivität von > 336 AU/ml beträgt die Spezifität 91,18 % und ab einer JCV-Antikörper-Aktivität von $> 761,5$ AU/ml beträgt sie 100 %. Die *Area under the curve* beträgt 0,7864, Standardabweichung = 0,039, 95 % Konfidenzintervall = 0,7101 bis 0,8627, $p < 0,0001$, signifikant

Die Abbildung verdeutlicht, dass ab einer AU > 336 eine Spezifität von 91,18 % vorliegt und ab einer AU $> 761,5$ eine Spezifität von 100 %. Die *Area under the curve* beträgt 0,7864. Mit einem p-Wert von $< 0,0001$ ist das Ergebnis hoch signifikant.

Die gleichen Berechnungen wurden dann für den JCV/BKV-Antikörper-Quotienten der JCV-Kontrollgruppe und der JCV-PML-Gruppe angefertigt. Das Ergebnis ist in Abbildung 8 dargestellt. Hierbei zeigt sich, dass die *Area under the curve* bei der Verwendung des JCV/BKV-Antikörper-Quotienten bei 0,8539 liegt. Ab einem JCV/BKV-Antikörper-Quotienten von $> 1,48$ beträgt die Spezifität 91,18 % und ab einem JCV/BKV-Antikörper-Quotienten von $> 3,665$ bereits 100 %.

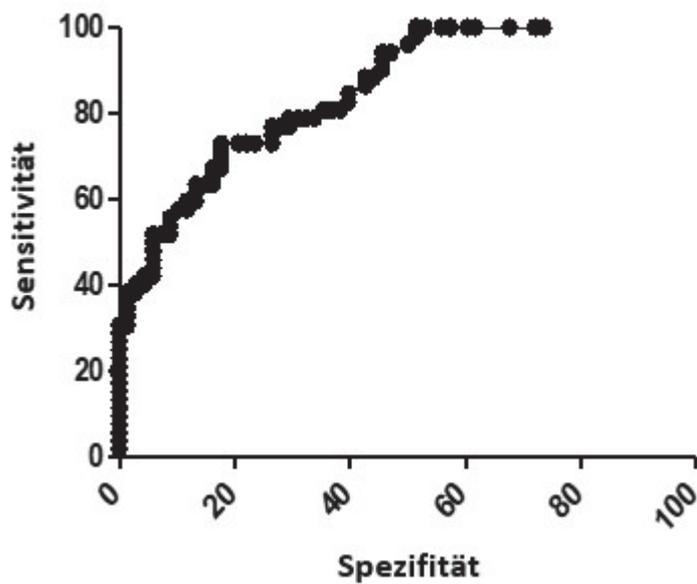


Abbildung 8: ROC-Kurve für die Bestimmung des JCV/BKV-Antikörper-Quotienten zur Wahrscheinlichkeit des Vorliegens einer PML

Dargestellt ist die Sensitivität auf der Y-Achse und die Spezifität auf der X-Achse. Ab einem JCV/BKV-Antikörper-Quotient von $> 1,48$ beträgt die Spezifität 91,18 % und ab einem JCV/BKV-Antikörper-Quotient von $> 3,665$ beträgt sie 100 %. Die *Area under the curve* beträgt 0,8539, Standardabweichung = 0,033, 95 % Konfidenzintervall = 0,7893 bis 0,9186, $p < 0,0001$, signifikant

3.2 Seroprävalenz des JC- und BK-Virus in der PML-Gruppe und in der Kontrollgruppe bei MS-Patienten unter Natalizumab Therapie

In einem weiteren Schritt wurde das Gesamtkollektiv aus 144 Patienten in eine Subgruppe, bestehend aus allen MS-Patienten unter Natalizumab-Therapie ($n = 57$) eingeteilt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: JCV- und BKV-Antikörper Status der unter Natalizumab-Therapie stehenden MS-Patienten der Kontroll- und der PML-Gruppe:

Es wurden Seren von 57 Patienten randomisiert untersucht. Hierunter waren 15 Patienten der Kontrollgruppe und 42 Patienten der PML-Gruppe unter Natalizumab Therapie. Die Seren wurden auf Vorhandensein von Antikörpern gegen JCV und BKV untersucht. p für JCV-Antikörper = 0,014, signifikant, p für BKV-Antikörper = 0,15, nicht signifikant

	Kontrollgruppe Natalizumab (n = 15)		PML-Gruppe Natalizumab (n = 42)	
	Positive (%)	Negative (%)	Positive (%)	Negative (%)
JCV-Antikörper	11 (73,3)	4 (26,7)	41 (97,6)	1 (2,4)
BKV-Antikörper	14 (93,3)	1 (6,7)	33 (78,6)	9 (21,4)

Die Kontrollgruppe bestand aus 15 und die PML-Gruppe aus 42 Natalizumab Patienten. In der Kontrollgruppe sind 73,3 % JCV seropositiv und 26,7 % seronegativ. 93,3 % der Patienten hatten Antikörper gegen BKV und 6,7 % zeigten diese Antikörper nicht. Anders war das Ergebnis in der PML-Gruppe. Hier sind 97,6 % JCV seropositiv und 2,4 % seronegativ. BKV-Antikörper konnten bei 78,6 % gefunden werden und bei 21,4 % nicht. Der p-Wert beträgt für die JCV-Antikörper 0,014 und ist somit signifikant. Der p-Wert der BKV-Antikörper ist mit einem p-Wert von 0,15 nicht signifikant.

Nachdem der Serostatus gegen die beiden Polyomaviren JC und BK in den Kohorten untersucht wurde, sollte jetzt auch bei den Natalizumab Patienten die Frage nach der Höhe der Antikörper-Aktivität geprüft werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16. JCV- und BKV-Antikörper-Aktivität von seropositiven MS-Patienten unter Natalizumab Therapie in der Kontrollgruppe und Patienten der PML-Gruppe:

Die Antikörper-Aktivität der seropositiven Patienten der Kontrollgruppe und der PML-Gruppe wurden unter Zuhilfenahme von Arbitrary Units (AU) miteinander verglichen. SE = Standardabweichung, Ø = Durchschnitt. JCV $p < 0,0001$, BKV $p = 0,794$

	Kontrollgruppe -seropositive- Natalizumab				PML-Gruppe -seropositive- Natalizumab			
	n	Ø (AU/ml)	SE	Konfidenzintervall (p = 95 %)	n	Ø (AU/ml)	SE	Konfidenzintervall (p = 95 %)
JCV- Antikörper	11	122,1	38	37,43-206,8	41	511,1	110,8	287,1-735,1
BKV- Antikörper	14	499,6	144,5	187,5-811,6	33	350,2	91,2	164,1-536,2

Die durchschnittliche Höhe der JCV-Antikörper-Aktivität beträgt in der Kontrollgruppe 122,1 AU/ml und die der BKV-Antikörper 499,6 AU/ml. In der PML-Gruppe hingegen wurden mit einer JCV-Antikörper-Aktivität von 511,1 AU/ml deutlich höhere durchschnittliche Arbitrary Units gemessen. Die gemessene BKV-Antikörper-Aktivität war mit 350,2 AU/ml geringer als in der Kontrollgruppe.

Zur Verdeutlichung der Ergebnisse aus Tabelle 16 wurden diese in Abbildung 9 und Abbildung 10 grafisch dargestellt. Verglichen wurden erneut die seropositiven Patienten aus der Kontroll- und der PML-Gruppe der unter Natalizumab Therapie stehenden MS-Patienten. Die Aktivität der Antikörper wurde in Arbitrary Units (AU) gemessen und miteinander verglichen.

Abbildung 9 zeigt, dass die Antikörper-Aktivität gegen das JC-Virus in der PML-Gruppe höher ist als in der Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis ist mit einem p-Wert von $< 0,0782$ nicht signifikant.

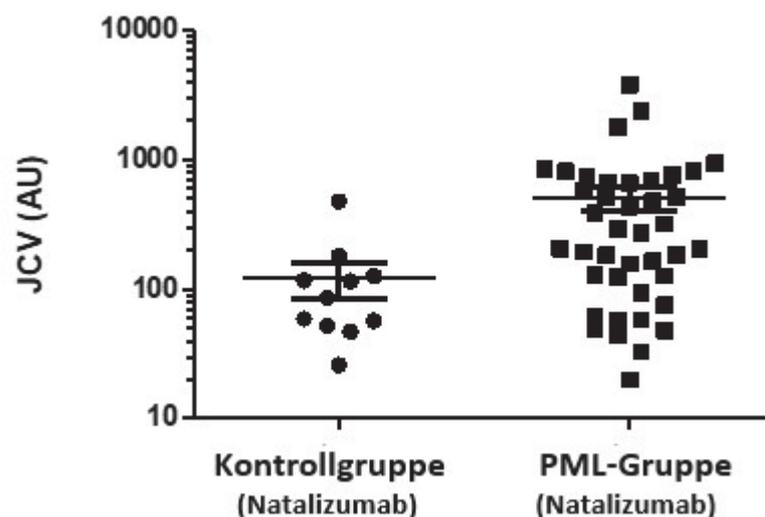


Abbildung 9: JCV-Antikörper-Aktivität von seropositiven MS-Patienten unter Natalizumab Therapie in der Kontrollgruppe und Patienten der PML-Gruppe:

Es wurden Seren von 57 Patienten randomisiert untersucht. Hierunter waren 15 Patienten der Kontrollgruppe und 42 Patienten der PML-Gruppe unter Natalizumab Therapie. Die JCV-Antikörper-Aktivität der seropositiven Patienten der Kontrollgruppe und der PML-Gruppe wurden unter Zuhilfenahme von Arbitrary Units (AU) miteinander verglichen und grafisch dargestellt. $p = < 0,0782$, nicht signifikant. Horizontale Linien = Mittelwert und Standardabweichung.

Die Antikörper-Aktivität gegen das BK-Virus unterscheidet sich in der Kontrollgruppe und in der PML-Gruppe nicht (siehe Abbildung 10).

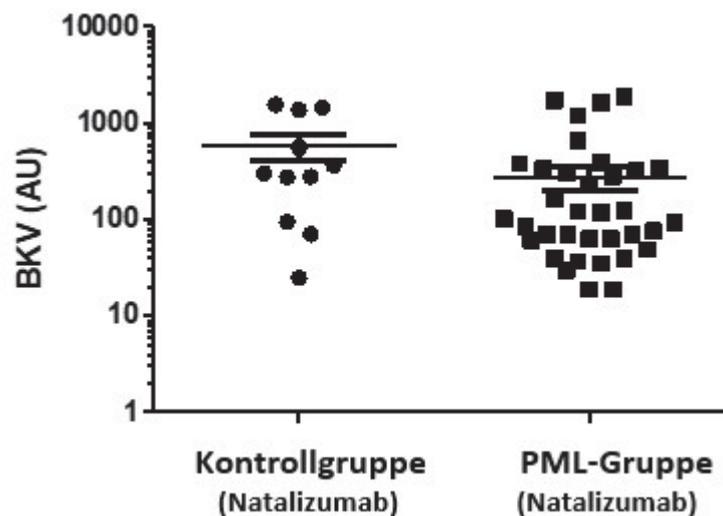


Abbildung 10: BKV-Antikörper-Aktivität von seropositiven MS-Patienten unter Natalizumab-Therapie in der Kontrollgruppe und Patienten der PML-Gruppe:

Es wurden Seren von 57 Patienten randomisiert untersucht. Hierunter waren 15 Patienten der Kontrollgruppe und 42 Patienten der PML-Gruppe unter Natalizumab-Therapie. Die BKV-Antikörper-Aktivität der seropositiven Patienten der Kontrollgruppe und der PML-Gruppe wurden unter Zuhilfenahme von Arbitrary Units (AU) miteinander verglichen und grafisch dargestellt. 6 der 57 Patienten aus dem Gesamtkollektiv waren seronegativ und sind daher aufgrund der logarithmischen Skalierung nicht dargestellt $p = < 0,079$, nicht signifikant. Horizontale Linien = Mittelwert und Standardabweichung.

Im Anschluss wurde erneut die Frage gestellt, was passiert, wenn bei einem einzelnen Patienten die Relation der JCV zu BKV-Antikörper in Beziehung gesetzt wird. Um dieser Frage nachzugehen, wurde auch hier der JCV/BKV-Antikörper-Quotient gebildet. Dies erfolgte bei den seropositiven Patienten aus beiden Kohorten und ist in Abbildung 11 grafisch dargestellt.

Wie in dem zuvor untersuchten Gesamtkollektiv gibt es auch in der Subgruppe der unter Natalizumab stehenden MS-Patienten einen bestimmten Quotienten, der ausschließlich in der PML-Gruppe gefunden werden konnte. Dieser Quotient liegt in dieser Subgruppe bei $> 3-4$.

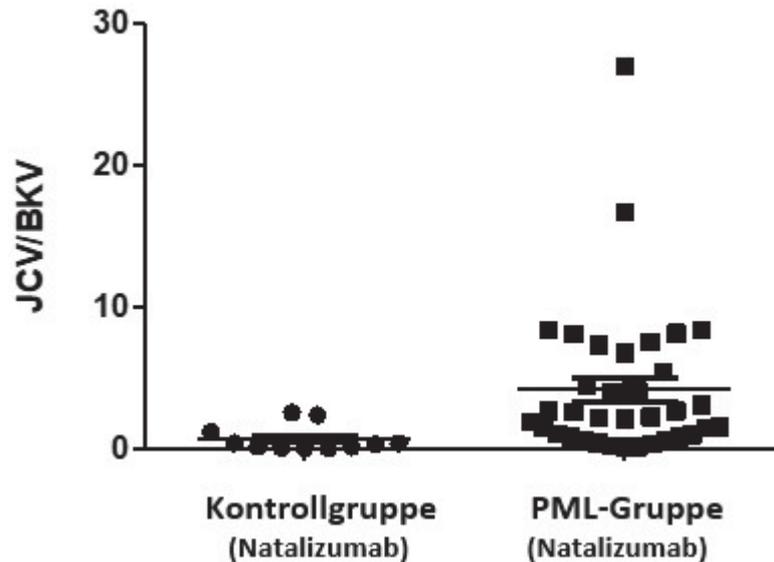


Abbildung 11: JCV/BKV-Antikörper- Quotient von seropositiven MS-Patienten unter Natalizumab-Therapie in der Kontrollgruppe und Patienten der PML-Gruppe:

Der JCV/BKV-Antikörper-Quotient wurde gebildet und grafisch dargestellt. $p = 0,037$, signifikant. Horizontale Linien = Mittelwert und Standardabweichung.

Auch in dieser Subgruppe sollte geprüft werden, ob eine Vorhersage zum Auftreten einer PML mit den erhobenen Daten gemacht werden kann. Erneut wurden ROC-Kurven angefertigt und die Spezifität sowie eine mögliche Vorhersage für das Auftreten einer PML überprüft. Die Ergebnisse in Abbildung 12 zeigen, dass ab einer AU von > 182 eine Spezifität von 90 % und ab einer AU von > 497 eine Spezifität von 100 % vorliegt. Die *Area under the curve* beträgt 0,7749.

Abbildung 13 zeigt eine ROC-Kurve des JCV/BKV-Antikörper-Quotienten von seropositiven MS-Patienten unter Natalizumab-Therapie. Diese Kurve verdeutlicht, dass ein JCV/BKV-Antikörper-Quotient von $> 2,47$ einer Spezifität von 90,91 % entspricht. Des Weiteren entspricht ein JCV/BKV-Antikörper-Quotient von $> 2,595$ einer Spezifität von 100 %. Die *Area under the curve* beträgt 0,8377.

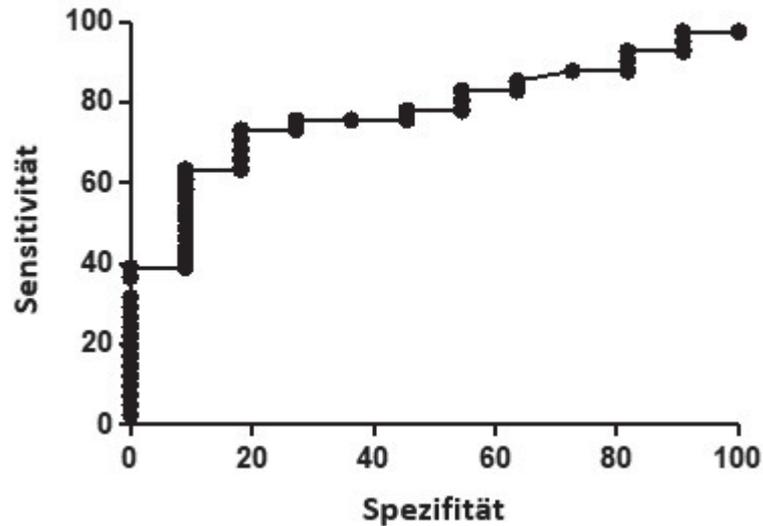


Abbildung 12: ROC-Kurve für die Bestimmung der JCV-Antikörperaktivität zur Wahrscheinlichkeit des Vorliegens einer PML bei MS-Patienten unter Natalizumab-Therapie:

Dargestellt ist die Sensitivität auf der Y-Achse und die Spezifität auf der X-Achse. Ab einer JCV-Antikörper-Aktivität von > 182 AU/ml beträgt die Spezifität 90 % und ab einer JCV-Antikörper-Aktivität von > 497 AU/ml beträgt sie 100 %. Die *Area under the curve* beträgt 0,7749, Standardabweichung = 0,0674, 95 % Konfidenzintervall = 0,6428 bis 0,9071, $p = 0,0055$, signifikant

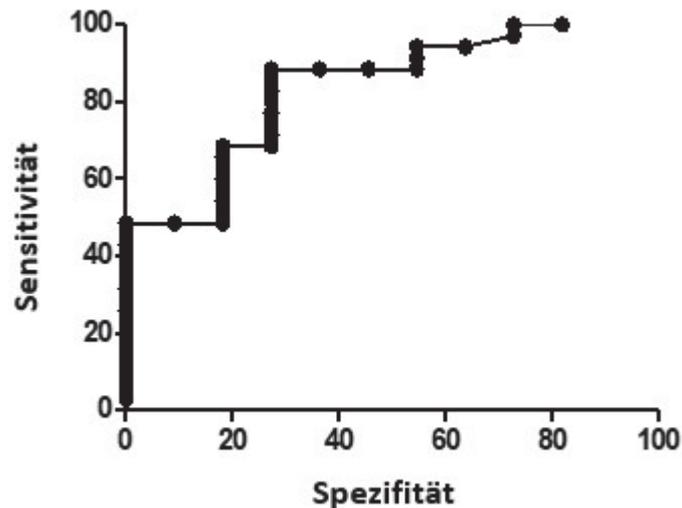


Abbildung 13: ROC-Kurve für die Bestimmung des JCV/BKV-Antikörper-Quotienten zur Wahrscheinlichkeit des Vorliegens einer PML bei MS-Patienten unter Natalizumab-Therapie

Dargestellt ist die Sensitivität auf der Y-Achse und die Spezifität auf der X-Achse. Ab einem JCV/BKV-Antikörper-Quotienten von > 2,47 beträgt die Spezifität 90,91 % und ab einem JCV/BKV-Antikörper-Quotienten von > 2,595 beträgt sie 100 %. Die *Area under the curve* beträgt 0,8377, Standardabweichung = 0,0669, 95 % Konfidenzintervall = 0,7065 bis 0,9688, $p = 0,00082$, signifikant

3.3 ELISA zur sequentiellen, serologischen Untersuchung ausgesuchter PML-Patienten

Die sequenzielle serologische Untersuchung der folgenden fünf PML Patienten sollte die Frage klären, ob es zwischen den Antikörpern des JC- und BK-Virus zu Kreuzreaktionen kommt. Hierfür wurde der in 2.2.7 vorgestellte ELISA verwendet. Abbildung 14 zeigt die Antikörper-Aktivität einer 1980 geborenen Patientin. Zum Zeitpunkt der ersten untersuchten Proben zeigte sich ein deutlicher Anstieg der JCV-Antikörper-Aktivität im Serum und im Liquor der Patientin.

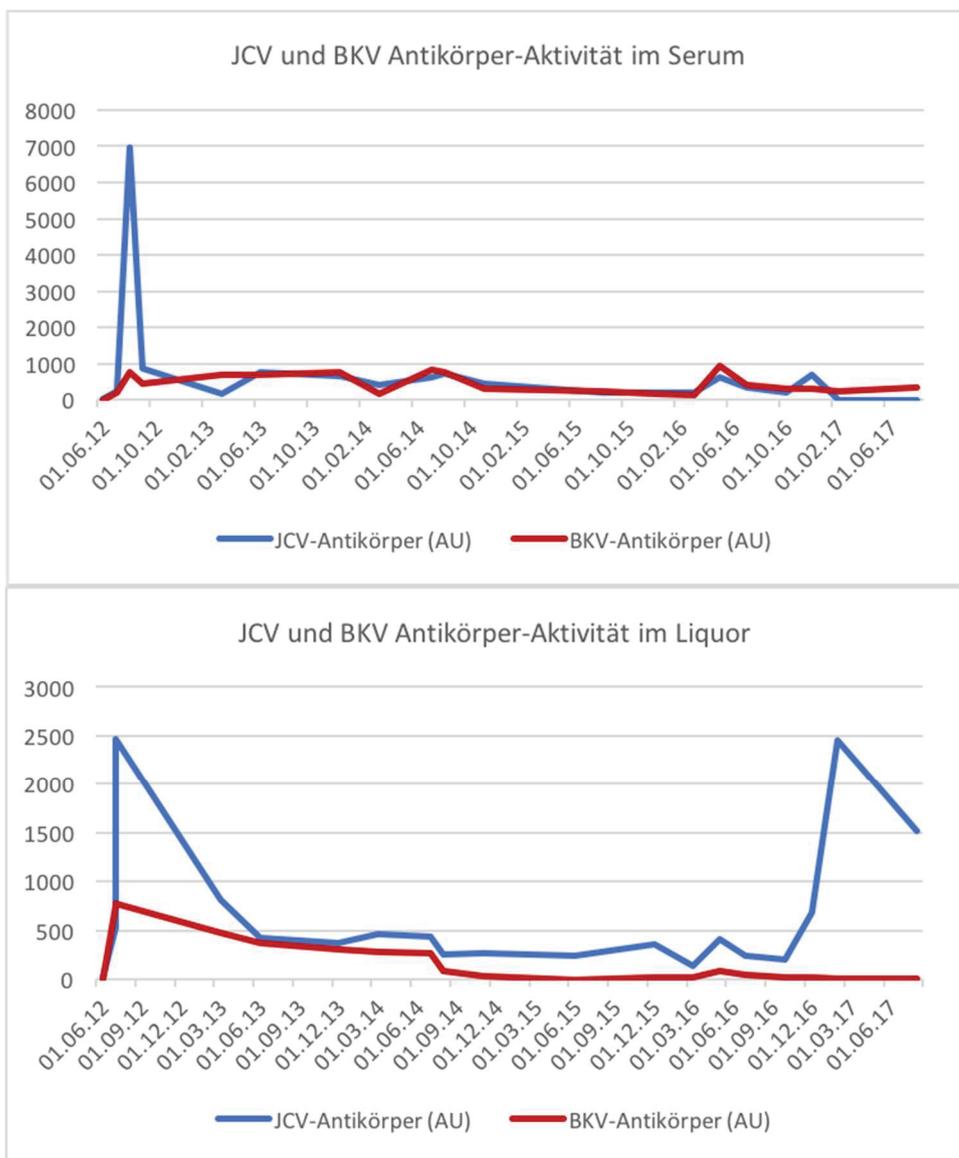


Abbildung 14: JCV und BKV-Antikörper-Aktivität im Serum (oben) und im Liquor (unten) einer 1980 geborenen Patientin mit der Diagnose PML. Gemessen wurde die Antikörper-Aktivität in Arbitrary Units (AU) zu elf verschiedenen Zeitpunkten im Krankheitsverlauf. Die Patientin wurde aufgrund einer MS mit Natalizumab therapiert. Der Verdacht auf eine PML wurde im April 2012 gestellt und die Diagnose am 15.05.2012 bestätigt.

Auch die Aktivität der Antikörper gegen das BK-Virus stieg mit zunehmender Höhe der JCV-Antikörper-Aktivität sowohl im Serum, als auch etwas schwächer im Liquor an. Dieser Anstieg verlief im Liquor noch etwas höher als im Serum. Andersherum zeigte sich beim Abfall der Antikörper-Aktivität gegen das JCV auch ein Abfall der Aktivität gegen das BKV. Diese Korrelation zeigte sich im Liquor noch deutlicher.

In Abbildung 15 ist die Antikörper-Aktivität gegen das JC- und das BK-Virus bei einer 1985 geborenen Patientin dargestellt.

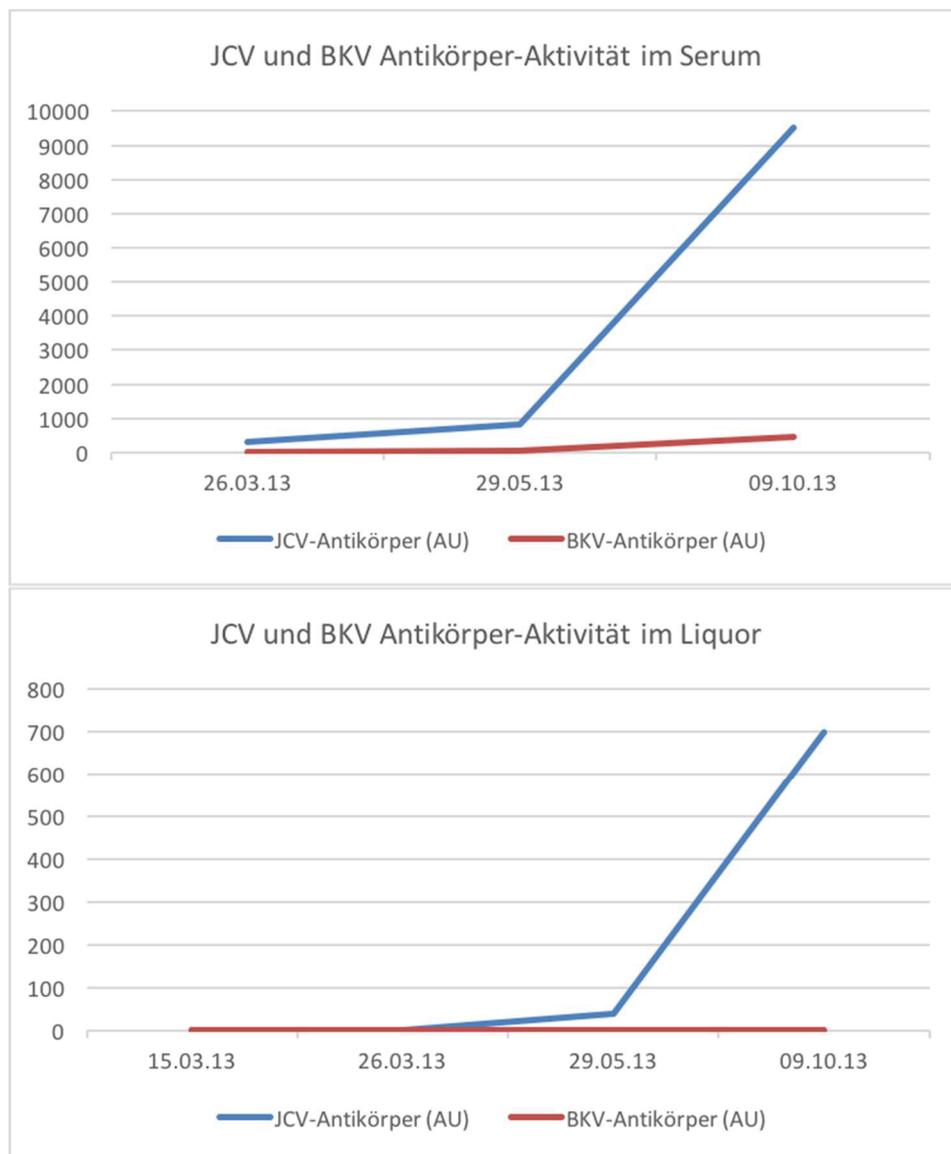


Abbildung 15: JCV und BKV-Antikörper-Aktivität im Serum (oben) und im Liquor (unten) einer 1985 geborenen Patientin mit der Diagnose PML. Gemessen wurde die Antikörper-Aktivität in Arbitrary Units (AU) und zu vier bzw. drei verschiedenen Zeitpunkten im Krankheitsverlauf. Die Patientin wurde aufgrund einer MS mit Natalizumab therapiert. Der Verdacht auf eine PML wurde am 14.03.2013 gestellt und die Diagnose am 15.03.2013 bestätigt.

Bei dieser Patientin fiel der parallele Anstieg der Antikörper-Aktivität des BKV geringer aus als in Abbildung 14. Eine diskrete Zunahme der BKV-Antikörper-Aktivität konnte lediglich im Serum beobachtet werden. Allerdings wies auch diese Patientin einen starken Anstieg der Antikörper-Aktivität gegen das JC-Virus sowohl im Serum als auch im Liquor auf.

Abbildung 16 demonstriert die Antikörper-Aktivität gegen das JC- und BKV-Virus einer 1962 geborenen Patientin. Hier zeigte sich ein starker Anstieg der Antikörper-Aktivität gegen beide Polyomaviren.

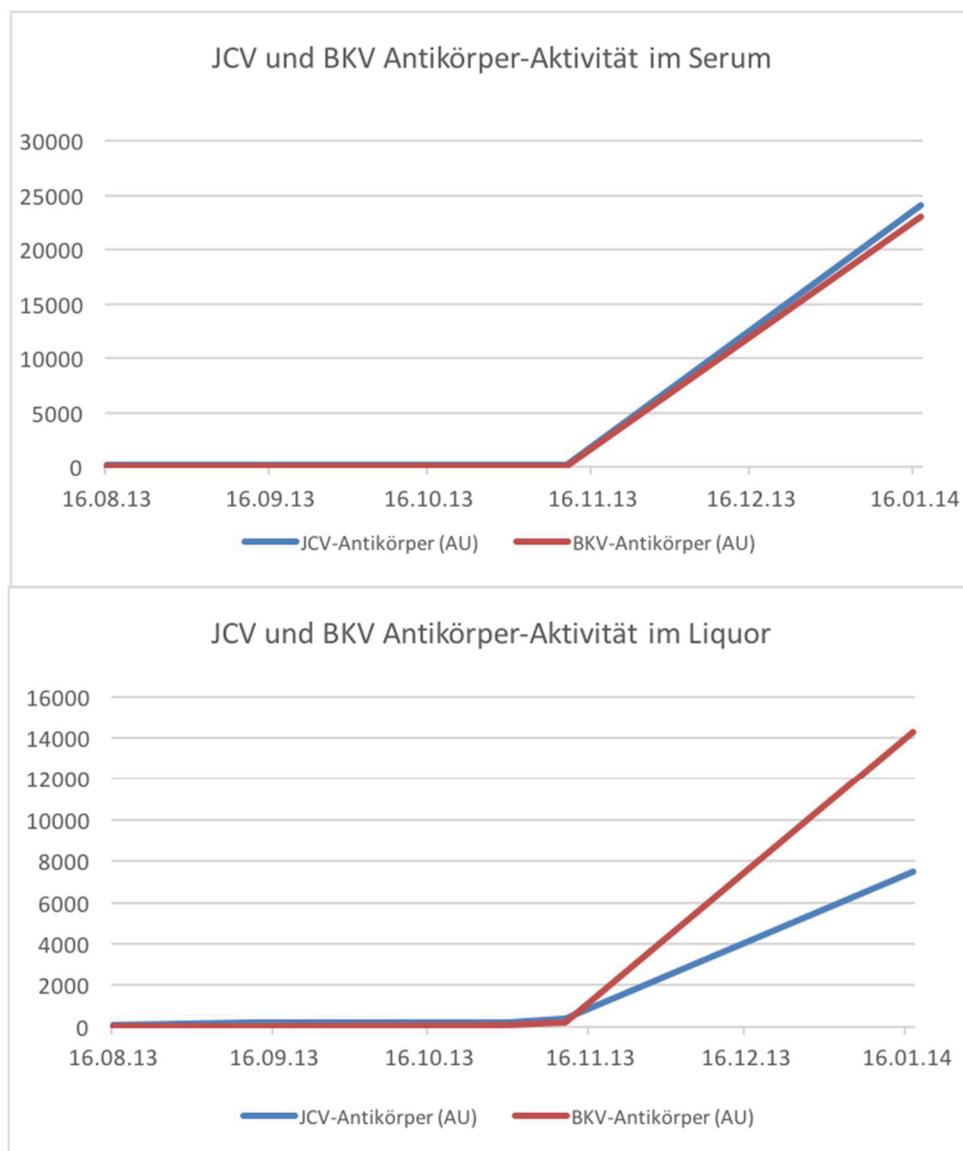


Abbildung 16: JCV und BKV-Antikörper-Aktivität im Serum (oben) und im Liquor (unten) einer 1962 geborenen Patientin mit der Diagnose PML. Gemessen wurde die Antikörper-Aktivität in Arbitrary Units (AU) und zu sechs verschiedenen Zeitpunkten im Krankheitsverlauf. Die Patientin wurde aufgrund einer MS mit Natalizumab therapiert. Der Verdacht auf eine PML wurde im Juli 2013 gestellt und die Diagnose am 16.08.2013 bestätigt.

Die Stärke der JCV- und BKV-Antikörper-Aktivität nahm im Serum dieser Patientin fast in gleichem Ausmaß zu. Im Liquor hingegen fiel der Anstieg der BKV-Antikörper-Aktivität etwas geringer aus. Dennoch präsentierte sich auch hier eine gemeinsame Zunahme der Aktivität gegen das JC- und BK-Virus.

Die Auswertung der vierten sequentiellen serologischen Untersuchung ist in Abbildung 17 dargestellt. Diese Patientin ist ebenfalls 1962 geboren und erkrankte an einer PML. Abgebildet ist die Antikörper-Aktivität gegen die Poliomaviren JCV und BKV im Krankheitsverlauf.

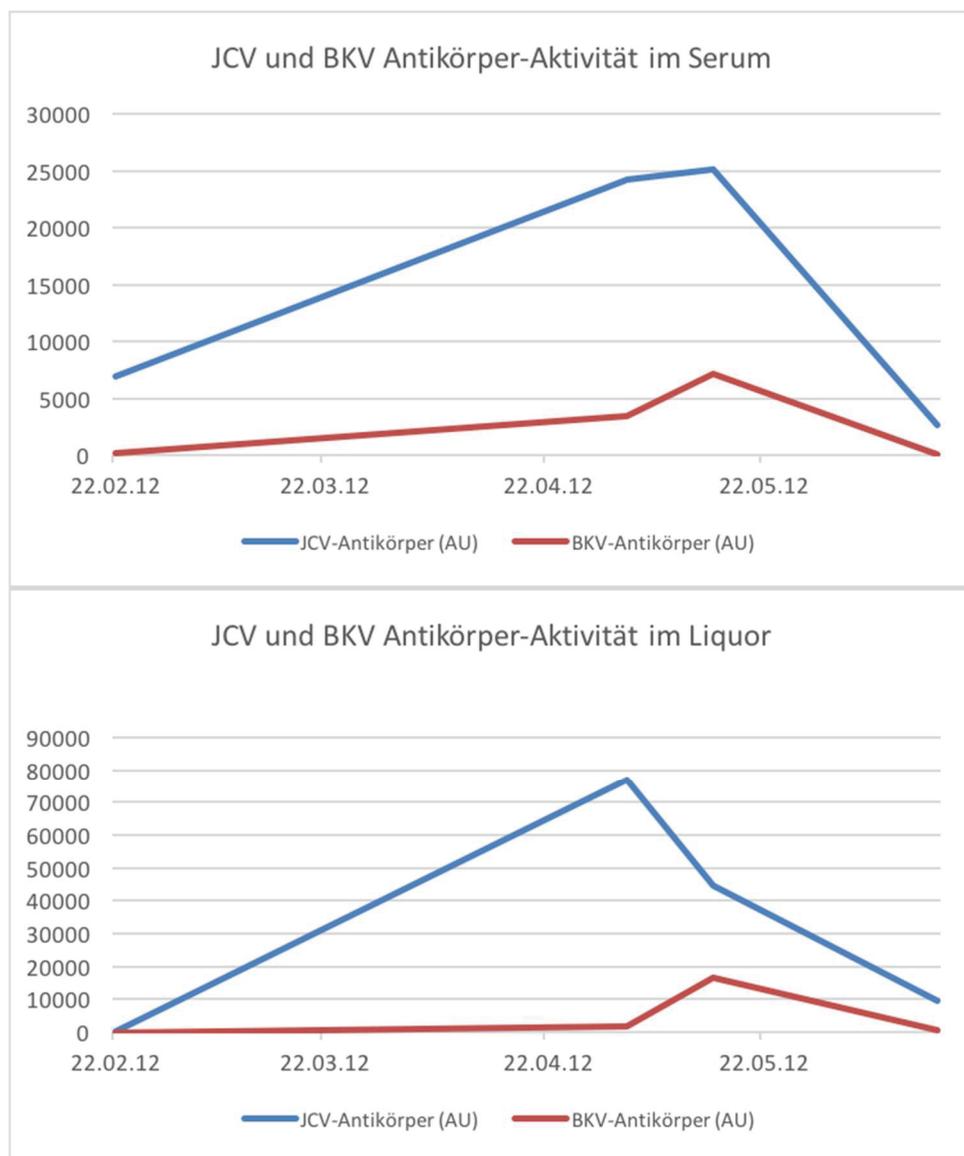


Abbildung 17: JCV und BKV-Antikörper-Aktivität im Serum (oben) und im Liquor (unten) einer 1962 geborenen Patientin mit der Diagnose PML. Gemessen wurde die Antikörper-Aktivität in Arbitrary Units (AU) und zu vier verschiedenen Zeitpunkten im Krankheitsverlauf. Die Patientin wurde aufgrund einer MS mit Natalizumab therapiert. Der Verdacht auf eine PML wurde am 02.02.2012 gestellt und die Diagnose am 10.02.2012 bestätigt.

Die Aktivität wurde auch hier im Serum und im Liquor bestimmt. Im Serum zeigte sich sowohl ein Anstieg der Antikörper-Aktivität gegen das JCV, als auch ein Anstieg gegen BKV. Die Zunahme der JCV-Antikörper-Aktivität war im Vergleich zur BKV-Antikörper-Aktivität stärker ausgeprägt. Dennoch wies sie auch bei dieser Patientin einen parallelen Anstieg und Abfall auf. Im Liquor konnte dieser gemeinsame Anstieg zu Beginn der PML nicht gezeigt werden. Allerdings kam es auch hier, wenn auch verzögert, zum Anstieg der JCV-Antikörper-Aktivität sowie zu einer Verstärkung der BKV-Antikörper-Aktivität. Im Verlauf präsentierte sich im Liquor, wie bereits für die Auswertung im Serum beschrieben, eine gemeinsame Abnahme der Antikörper-Aktivität gegen das JC- und BK-Virus.

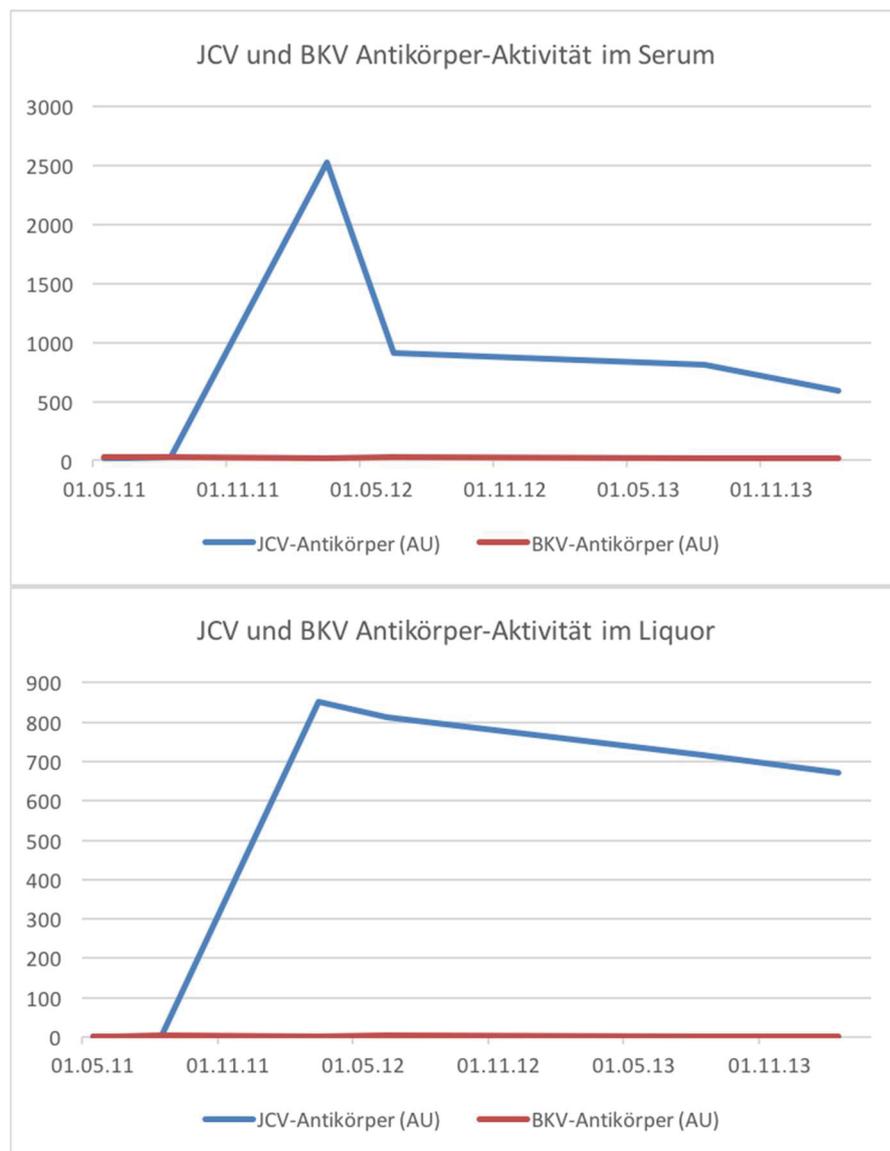


Abbildung 18: JCV und BKV-Antikörper-Aktivität im Serum (oben) und im Liquor (unten) einer 1944 geborenen Patientin mit der Diagnose PML. Gemessen wurde die Antikörper-Aktivität in Arbitrary Units (AU) zu sechs verschiedenen Zeitpunkten im Krankheitsverlauf. Klinische Angaben zum erstmaligen Verdacht auf eine PML sowie der Bestätigung einer PML waren nicht verfügbar.

In Abbildung 18 ist die Antikörper-Aktivität gegen das JC- und BK-Virus einer 1944 geborenen Patientin dargestellt. Bei dieser Patientin ist ein Anstieg der Antikörper-Aktivität gegen das JC-Virus zu beobachten. Dieser zeigt sich parallel im Serum und im Liquor. Die Aktivität in beiden Materialien fällt im Verlauf wieder ab. Dies geschieht im Serum deutlich schneller als im Liquor. Bei dieser Patientin zeigte sich, im Gegensatz zu den zuvor dargestellten Ergebnissen der anderen Patientinnen, kein Anstieg der Antikörper-Aktivität gegen das BK-Virus sowohl im Serum als auch im Liquor.

4 Diskussion

4.1 JCV und BKV Seroprävalenz im Vergleich zur aktuellen Literatur

Die ersten Experimente dieser Dissertation dienten der Erhebung der Seroprävalenz des JC- und BK-Virus in einer Kontroll- und einer PML-Gruppe. Später wurden diese Gruppen in Subgruppen unterteilt, in denen ausschließlich die Daten von MS-Patienten unter Natalizumab Therapie betrachtet wurden. Tabelle 13 zeigt, dass in der Kontrollgruppe 72,7 % der Patienten seropositiv für das JC-Virus und 88,3 % seropositiv für das BK-Virus sind. Diese Verteilung entspricht weitestgehend den Ergebnissen der aktuelleren Literatur (50-53). Lediglich die BKV-Seroprävalenz ist in einigen der zitierten Arbeiten geringer. In der PML-Gruppe ist die Durchseuchung mit dem JC-Virus deutlich höher (94 %). Da die Patienten dieser Gruppe jedoch an einer PML erkrankt sind, die durch das JC-Virus verursacht wurde, können die hohen Zahlen damit schlüssig erklärt werden. Zwei der vier seronegativen Patienten der PML-Gruppe standen unter Rituximab-Therapie und waren wahrscheinlich aufgrund der niedrigen oder nicht vorhandenen B-Zellen-Anzahl nicht in der Lage, Antikörper gegen das JC-Virus zu produzieren. Bei den weiteren zwei JCV-seronegativen Patienten gibt die Grunderkrankung oder Therapie keinen Anhalt für die nicht vorhandenen Antikörper. Dieses Phänomen erscheint selten, ist jedoch in der aktuellen Literatur bereits beschrieben (100). Überraschenderweise unterschied sich die BKV-Seroprävalenz signifikant zwischen der PML- und der Kontrollgruppe. Hier waren mit 25,4 % der PML-Patienten fast doppelt so viele seronegativ wie in der Kontrollgruppe. Ob es sich dabei um eine mögliche Kreuzprotektion handelt, wird in Kapitel 4.2 ausführlich diskutiert.

In der Subgruppe der unter Natalizumab stehenden MS-Patienten stellen sich die oben beschriebenen Seroprävalenzen ähnlich dar. Allerdings ist die statistische Aussagekraft in dieser Kohorte aufgrund der geringeren Stichprobengröße, besonders in der Kontrollgruppe, etwas kleiner. Aber auch hier sind in der PML-Gruppe mit 21,4 % wesentlich mehr Patienten seronegativ für das BK-Virus als in der Kontrollgruppe mit 6,7 %. Auch dieses Ergebnis wird in Kapitel 4.2 diskutiert.

4.2 Kreuzprotektion zwischen den Polyomaviren JC und BK

In diesem Abschnitt soll die Frage diskutiert werden, ob eine Infektion mit dem BK-Virus zu einer Protektion gegen eine JCV-Infektion führen könnte. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass PML-Patienten signifikant häufiger seronegativ gegen das BK-Virus sind als Patienten aus der Kontrollgruppe (Tabelle 13). Auch in der Subgruppe der unter Natalizumab-Therapie stehenden MS-Patienten konnte dieses Phänomen beobachtet werden (Tabelle 15). Bereits in früheren Publikationen wurden ähnliche Ergebnisse beschrieben (51). So konnten Knowles, W.A. et al bei Patienten < 40 Jahre zeigen, dass in der Gruppe der BKV-seropositiven 25 % auch JCV-seropositiv, in der Gruppe der BKV-seronegativen jedoch fast 53 % seropositiv für das JC-Virus waren (94). Eine weitere Studie bei JCV-seropositiven Individuen führte zu dem Ergebnis, dass BKV-seropositive Individuen seltener JCV im Urin auszuschcheiden scheinen als BKV-seronegative (95). Dies könnte für eine mögliche Kreuzprotektion zwischen dem BK- und dem JC-Virus sprechen. Eine Arbeit, in der diese These weiter gestützt wird, ist von Rossi, F. et al. Hier wurde gezeigt, dass hohe Level an Antikörpern gegen BKV 1 und 4 mit einem geringeren Risiko, eine PML zu entwickeln assoziiert waren (54). Allerdings wurden in dieser Studie Seren aus den 1980er und 90er Jahren von HIV-Patienten verwendet, wohingegen in dieser Arbeit Seren aus den letzten Jahren und hauptsächlich von MS-Patienten unter Natalizumab Therapie getestet wurden.

Drei im Jahre 2018 im *New England Journal of Medicine* erschienene Fallberichte bestätigen die Ergebnisse dieser Dissertation weiter (102). Die Autoren haben drei Patienten, die an einer PML im Rahmen ihrer jeweiligen Grunderkrankung bzw. der jeweiligen Therapien erkrankt waren, mithilfe von *ex vivo* vermehrten, teilweise HLA-passenden und kryokonservierten BKV spezifischen T-Zellen therapiert. Nach der ersten Infusion der T-Zellen kam es bei allen drei Patienten zu einer Reduktion der JC-Viruslast im Liquor. Bei einem Patienten führte die Therapie sogar zur kompletten Resolution der neurologischen Symptome sowie zur Reduktion der Läsionen in der weißen Substanz, die im MRT gesehen wurden. Die Autoren konnten zeigen, dass BKV-spezifische T-Zellen JCV erkennen und sie identifizierten Epitope, gegen die diese gerichtet sind.

Im Folgenden wird beschrieben, wie es zu einer Kreuzprotektion kommen könnte. Die Polyomaviren JC und BK sind genetisch eng verwandt. So haben sie in ihrer Proteinsequenz eine Ähnlichkeit von über 85 %, was zu einer immunologischen

Kreuzprotektion führen könnte (54). Es konnte gezeigt werden, dass es kreuzreaktive T-Zell-Epitope in den Capsidproteinen des BKV und JCV gibt (59) sowie mutmaßliche T-Zell-Epitope mit einer identischen Aminosäuresequenz (54). Die genauen Mechanismen, die zu einer Kreuzprotektion führen, sollten weiter untersucht werden und könnten in der Zukunft zu einer präventiven Therapie gegen das JC-Virus führen. So könnte zum Beispiel ein möglicher Impfstoff sowohl Antigene des JC-Virus als auch des BK-Virus enthalten.

4.3 Kreuzreaktionen zwischen den Polyomaviren JC und BK

Eine weitere wichtige Frage dieser Arbeit war, ob es zu Kreuzreaktionen zwischen den Antikörpern des BKV und JCV kommt. Durch eine Voradsorption mit dem heterologen VP1 wurde versucht, mögliche Kreuzreaktionen im verwendeten ELISA so gering wie möglich zu halten (2.2.7).

Es wurden Seren und Liquores von fünf Patienten im Verlauf einer manifesten PML untersucht und die Antikörper-Aktivität gegen das JC- und BK-Virus gemessen (3.3). In Abbildung 14 sieht man, dass es besonders im Liquor mit Anstieg der Antikörper-Aktivität gegen das JC-Virus auch zu einem Anstieg der Antikörper-Aktivität gegen das BK-Virus kommt. Auch im weiteren Verlauf kommt es zu einem fast parallel verlaufenden Anstieg und Abfall der Antikörper-Aktivität. Lediglich am Ende kann dies nicht weiter beobachtet werden. Auch in Abbildung 15 ist eine, wenn auch nur leichte, Mitreaktion der Antikörper-Aktivität gegen das BKV im Serum der Patientin zu sehen. Besonders eindrucksvoll konnten die Kreuzreaktionen bei zwei weiteren Patienten beobachtet werden. In Abbildung 16 kam es bei der Patientin zu einem parallelen Anstieg der Antikörper-Aktivität gegen beide Polyomaviren. Abbildung 17 zeigt, dass es nach einem gemeinsamen Anstieg der Antikörper-Aktivität auch wieder zu einem Abfall der Antikörper-Aktivität sowohl im Serum als auch im Liquor der Patientin kommt. Lediglich bei einer Patientin konnte kein gemeinsamer Anstieg der Antikörper-Aktivität beobachtet werden (Abbildung 18).

Dem gemeinsamen Anstieg der Antikörper-Aktivität könnte auch eine Superinfektion mit dem BK-Virus zu Grunde liegen. Dagegen spricht jedoch, dass es zu einem parallelen Anstieg und Abfall der Aktivität der Antikörper gegen beide Polyomaviren kommt. Wir denken daher, dass der Grund viel wahrscheinlicher eine Kreuzreaktion ist. Hierfür

verantwortlich könnte die zu 78 % identische Aminosäure-Sequenz des VP1 zwischen dem BKV und JCV sein (57). Wir schließen daraus, dass es ab einer bestimmten Höhe der Antikörper-Aktivität in unserem Test, trotz der vorherigen Voradsorption mit dem heterologen VP1, zu Kreuzreaktionen kommt.

4.4 Der Stellenwert der Polyomavirus-Serologie in der Diagnostik der PML

Bereits die vorherigen Ergebnisse zeigen, dass die reine BKV-Seronegativität in der PML-Gruppe erhöht ist und somit einen möglichen Risikofaktor zur Entwicklung einer PML darstellen könnte. Die Aktivität der Antikörper gegen das BK- und JC-Virus könnte ein neuer Parameter in der PML Diagnostik sein.

Bereits der zuvor erwähnte StratifyJCV®-ELISA der Firma Biogen verwendet einen Index, der sich aus dem Verhältnis zwischen der Antikörper-Aktivität gegen das JC-Virus im Serum der Patienten und der Antikörper-Aktivität gegen eine JCV-positive Kalibratorprobe berechnet (101). Ein Index größer 0,9 ist mit einem erhöhten Risiko assoziiert, eine PML zu entwickeln (72).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Antikörper-Aktivität gegen das JCV und BKV ermittelt und im folgenden Schritt in einem Quotienten verrechnet. Wie in Tabelle 14 zu sehen, zeigt schon die Antikörper-Aktivität ohne Verrechnung in einem Quotienten, dass diese in der PML-Gruppe deutlich höher ist als in der Kontrollgruppe. In der Kontrollgruppe beträgt die durchschnittliche Höhe der JCV-Antikörper-Aktivität 137 AU/ml und in der PML-Gruppe 446,3 AU/ml. Da eine PML auf der Grundlage einer JCV-Infektion entsteht, erscheint es schlüssig, dass in der PML-Gruppe die Aktivität der Antikörper gegen das JC-Virus erhöht ist. Eine erhöhte JCV-Präsenz dient als Stimulus für das Immunsystem und dies spiegelt sich dann in der Antikörperpräsenz wieder. Abbildung 3 und Abbildung 4 stellen die Ergebnisse noch einmal grafisch da. Diese Ergebnisse stellen noch keine Neuerung in der PML-Diagnostik dar. Wir haben daher einen Quotienten, der beim einzelnen Patienten die individuelle JCV- und BKV-Antikörper-Aktivität zu jedem Messzeitpunkt in Beziehung setzt, berechnet. Die Verrechnung der Antikörper-Aktivität in diesen Quotienten erhöht die Spezifität und auch die Sensitivität des Testes und es wird eine bessere Diskriminierung von PML-Gruppe zu Kontrollgruppe erreicht. Die in Abbildung 5 und Abbildung 6 dargestellten Ergebnisse

zeigen deutlich, dass in der PML-Gruppe Patienten einen JCV/BKV-Quotienten von > 4 erreicht haben, der in der Kontrollgruppe nicht gefunden werden konnte. Die Ergebnisse aus den beiden Abbildungen sind mit einem p-Wert von $< 0,001$ signifikant. Ein erhöhter JCV/BKV-Quotient könnte somit für ein erhöhtes PML-Risiko sprechen.

Zuletzt sollte geprüft werden, ob eine Vorhersage zum Auftreten einer PML mit den erhobenen Daten gemacht werden kann. Hierfür wurden ROC-Analysen durchgeführt. Die Berechnung der ROC-Kurve nur auf der Grundlage der JCV-Antikörper-Aktivität (Abbildung 7) ergibt eine Spezifität von 91,18 % ab einer AU > 336 und eine Spezifität von 100 % ab einer AU $> 761,5$. Die zugehörige *Area under the curve* beträgt 0,7864. Wir können also bereits hier eine Vorhersage zum Auftreten einer PML machen. Auch diese Analyse wurde zusätzlich mit Einbeziehung der BKV-Antikörper-Aktivität, also dem JCV-BKV-Quotienten, durchgeführt (Abbildung 8). Ab einem JCV/BKV-Antikörper-Quotienten von $> 1,48$ beträgt die Spezifität 91,18 % und ab einem JCV/BKV-Antikörper-Quotienten von $> 3,665$ bereits 100 %. Die *Area under the curve* liegt unter Verwendung des JCV/BKV-Antikörper-Quotienten bei 0,8539. Auch diese Ergebnisse zeigen, dass die Verrechnung der Antikörper-Aktivität in einen JCV/BKV-Quotienten zu einer besseren möglichen Vorhersage einer PML führen.

Abschließend wurde in der Subgruppe der unter Natalizumab stehenden MS-Patienten ebenfalls die Antikörper-Aktivität gegen das JCV und BKV untersucht. Auch hier lag die durchschnittliche Höhe der JCV-Antikörper-Aktivität mit 511,1 AU/ml in der PML-Gruppe deutlich höher als mit 122,1 AU/ml in der Kontrollgruppe (Tabelle 16). Dieses Ergebnis war, wie bereits weiter oben erwähnt, bei einer Erkrankung, die durch das JC-Virus ausgelöst wird, zu erwarten. Die in Abbildung 9 und Abbildung 10 grafisch dargestellten Ergebnisse ergeben daher auch ein ähnliches Bild wie im Gesamtkollektiv, bestehend aus Kontroll- und PML-Gruppe. Auch in der Subgruppe der unter Natalizumab stehenden MS-Patienten gibt es einen bestimmten Quotienten, der ausschließlich in der PML-Gruppe gefunden werden konnte. Dieser Quotient liegt hier bei $> 3-4$ (Abbildung 11). Spätestens beim Erreichen dieses Quotienten kann von der Manifestation einer PML ausgegangen werden.

Zuletzt zeigen die Ergebnisse, dass auch in der Subgruppe der unter Natalizumab stehenden MS-Patienten eine Vorhersage zum Auftreten einer PML mit den erhobenen Daten gemacht werden kann. Abbildung 12 zeigt, dass ab einer AU von > 182 eine

Spezifität von 90 % und ab einer AU von > 497 eine Spezifität von 100 % vorliegt. Die *Area under the curve* beträgt 0,7749. Die Berechnung des JCV-BKV-Quotienten und die damit erstellte ROC-Kurve (Abbildung 13) hat ab einem Quotienten von $> 2,47$ eine Spezifität von 90,91 % und ab einem Quotienten von $> 2,595$ eine Spezifität von 100 %. Auch hier gilt, dass ab einem Quotienten, der größer ist als 2,595, eine manifeste PML vorliegt. Die *Area under the curve* beträgt 0,8377 und ist somit auch in der Subgruppe unter Verwendung des JCV/BKV-Antikörper-Quotienten besser als unter dem Gebrauch der JCV-Antikörper-Aktivität.

Die Einbeziehung der Antikörper-Aktivität gegen das BK-Virus und die anschließende Berechnung eines JCV/BKV-Quotienten führt zu einer besseren Vorhersage zum Auftreten einer PML. Die gleichzeitige Bestimmung der JCV- und BKV-Antikörper und die Berechnung des oben diskutierten Quotienten könnte daher ein wichtiges neues Werkzeug in der Diagnostik der PML sein.

5 Literaturverzeichnis

1. Jelcic I, Combaluzier B, Jelcic I, Faigle W, Senn L, Reinhart BJ, et al. Broadly neutralizing human monoclonal JC polyomavirus VP1-specific antibodies as candidate therapeutics for progressive multifocal leukoencephalopathy. *Science translational medicine*. 2015;7(306):306ra150.
2. Gross L. A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1953;83(2):414-21.
3. Stewart SE, Eddy BE, Borgese N. Neoplasms in mice inoculated with a tumor agent carried in tissue culture. *J Natl Cancer Inst*. 1958;20(6):1223-43.
4. Modrow S. *Molekulare Virologie*. Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl.; 1997.
5. Padgett BL, Walker DL, ZuRhein GM, Eckroade RJ, Dessel BH. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Lancet*. 1971;1(7712):1257-60.
6. Gardner SD, Field AM, Coleman DV, Hulme B. New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet*. 1971;1(7712):1253-7.
7. Modrow S. *Molekulare Virologie: Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg*; 2010.
8. Knipe DM. *Fields Virology*. 5th ed: Lippincott, William & Wilkins; 2006.
9. Riley MI, Yoo W, Mda NY, Folk WR. Tiny T antigen: an autonomous polyomavirus T antigen amino-terminal domain. *J Virol*. 1997;71(8):6068-74.
10. Zerrahn J, Knippschild U, Winkler T, Deppert W. Independent expression of the transforming amino-terminal domain of SV40 large T antigen from an alternatively spliced third SV40 early mRNA. *EMBO J*. 1993;12(12):4739-46.
11. Kalderon D, Roberts BL, Richardson WD, Smith AE. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell*. 1984;39(3 Pt 2):499-509.
12. Lanford RE, Butel JS. Construction and characterization of an SV40 mutant defective in nuclear transport of T antigen. *Cell*. 1984;37(3):801-13.
13. Lanford RE, Butel JS. Replicative functions of the SV40(cT)-3 mutant defective for nuclear transport of T antigen. *Virology*. 1985;147(1):72-80.
14. Scheidtmann KH, Echle B, Walter G. Simian virus 40 large T antigen is phosphorylated at multiple sites clustered in two separate regions. *J Virol*. 1982;44(1):116-33.
15. Jarvis DL, Butel JS. Modification of simian virus 40 large tumor antigen by glycosylation. *Virology*. 1985;141(2):173-89.
16. Klockmann U, Deppert W. Acylated simian virus 40 large T-antigen: a new subclass associated with a detergent-resistant lamina of the plasma membrane. *EMBO J*. 1983;2(7):1151-7.
17. Mellor A, Smith AE. Characterization of the amino-terminal tryptic peptide of simian virus 40 small-t and large-T antigens. *J Virol*. 1978;28(3):992-6.
18. Goldman N, Brown M, Khoury G. Modification of SV40 T antigen by poly ADP-ribosylation. *Cell*. 1981;24(2):567-72.

19. Ellman M, Bikel I, Figge J, Roberts T, Schlossman R, Livingston DM. Localization of the simian virus 40 small t antigen in the nucleus and cytoplasm of monkey and mouse cells. *J Virol*. 1984;50(2):623-8.
20. Yang SI, Lickteig RL, Estes R, Rundell K, Walter G, Mumby MC. Control of protein phosphatase 2A by simian virus 40 small-t antigen. *Mol Cell Biol*. 1991;11(4):1988-95.
21. Krauzewicz N, Streuli CH, Stuart-Smith N, Jones MD, Wallace S, Griffin BE. Myristylated polyomavirus VP2: role in the life cycle of the virus. *J Virol*. 1990;64(9):4414-20.
22. Jelcic I, Jelcic I, Kempf C, Largey F, Planas R, Schippling S, et al. Mechanisms of immune escape in central nervous system infection with neurotropic JC virus variant. *Annals of neurology*. 2016;79(3):404-18.
23. Breau WC, Atwood WJ, Norkin LC. Class I major histocompatibility proteins are an essential component of the simian virus 40 receptor. *J Virol*. 1992;66(4):2037-45.
24. Tsai B, Gilbert JM, Stehle T, Lencer W, Benjamin TL, Rapoport TA. Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40. *EMBO J*. 2003;22(17):4346-55.
25. Low JA, Magnuson B, Tsai B, Imperiale MJ. Identification of gangliosides GD1b and GT1b as receptors for BK virus. *J Virol*. 2006;80(3):1361-6.
26. Elphick GF, Querbes W, Jordan JA, Gee GV, Eash S, Manley K, et al. The human polyomavirus, JCV, uses serotonin receptors to infect cells. *Science*. 2004;306(5700):1380-3.
27. DeCaprio JA, Ludlow JW, Figge J, Shew JY, Huang CM, Lee WH, et al. SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell*. 1988;54(2):275-83.
28. Harris KF, Christensen JB, Imperiale MJ. BK virus large T antigen: interactions with the retinoblastoma family of tumor suppressor proteins and effects on cellular growth control. *J Virol*. 1996;70(4):2378-86.
29. Delos SE, Montross L, Moreland RB, Garcea RL. Expression of the polyomavirus VP2 and VP3 proteins in insect cells: coexpression with the major capsid protein VP1 alters VP2/VP3 subcellular localization. *Virology*. 1993;194(1):393-8.
30. Kasamatsu H, Nehorayan A. Vp1 affects intracellular localization of Vp3 polypeptide during simian virus 40 infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1979;76(6):2808-12.
31. Norkin LC, Ouellette J. 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*. 1976;18(1):48-57.
32. Clayson ET, Brando LV, Compans RW. Release of simian virus 40 virions from epithelial cells is polarized and occurs without cell lysis. *J Virol*. 1989;63(5):2278-88.
33. Hedquist BG, Bratt G, Hammarin AL, Grandien M, Nennesmo I, Sundelin B, et al. Identification of BK virus in a patient with acquired immune deficiency syndrome and bilateral atypical retinitis. *Ophthalmology*. 1999;106(1):129-32.
34. Sandler ES, Aquino VM, Goss-Shohet E, Hinrichs S, Krisner K. BK papova virus pneumonia following hematopoietic stem cell transplantation. *Bone marrow transplantation*. 1997;20(2):163-5.

35. Voltz R, Jager G, Seelos K, Fuhry L, Hohlfeld R. BK virus encephalitis in an immunocompetent patient. *Archives of neurology*. 1996;53(1):101-3.
36. Apperley JF, Rice SJ, Bishop JA, Chia YC, Krausz T, Gardner SD, et al. Late-onset hemorrhagic cystitis associated with urinary excretion of polyomaviruses after bone marrow transplantation. *Transplantation*. 1987;43(1):108-12.
37. Hirsch HH, Brennan DC, Drachenberg CB, Ginevri F, Gordon J, Limaye AP, et al. Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analyses and recommendations. *Transplantation*. 2005;79(10):1277-86.
38. Boubenider S, Hiesse C, Marchand S, Hafi A, Kriaa F, Charpentier B. Post-transplantation polyomavirus infections. *J Nephrol*. 1999;12(1):24-9.
39. Gardner SD, MacKenzie EF, Smith C, Porter AA. Prospective study of the human polyomaviruses BK and JC and cytomegalovirus in renal transplant recipients. *Journal of clinical pathology*. 1984;37(5):578-86.
40. Arai Y, Tsutsui Y, Nagashima K, Shinmura Y, Kosugi T, Wakai M, et al. Autopsy case of the cerebellar form of progressive multifocal leukoencephalopathy without immunodeficiency. *Neuropathology*. 2002;22(1):48-56.
41. Rockwell D, Ruben FL, Winkelstein A, Mendelow H. Absence of immune deficiencies in a case of progressive multifocal leukoencephalopathy. *The American journal of medicine*. 1976;61(3):433-6.
42. Miskin DP, Korálnik IJ. Novel syndromes associated with JC virus infection of neurons and meningeal cells: no longer a gray area. *Curr Opin Neurol*. 2015;28(3):288-94.
43. Weber T, Major EO. Progressive multifocal leukoencephalopathy: molecular biology, pathogenesis and clinical impact. *Intervirology*. 1997;40(2-3):98-111.
44. Major EO, Amemiya K, Tornatore CS, Houff SA, Berger JR. Pathogenesis and molecular biology of progressive multifocal leukoencephalopathy, the JC virus-induced demyelinating disease of the human brain. *ClinMicrobiolRev*. 1992;5(1):49-73.
45. Dubois V, Dutronc H, Lafon ME, Poinot V, Pellegrin JL, Ragnaud JM, et al. Latency and reactivation of JC virus in peripheral blood of human immunodeficiency virus type 1-infected patients. *J Clin Microbiol*. 1997;35(9):2288-92.
46. Knowles WA, Pipkin P, Andrews N, Vyse A, Minor P, Brown DW, et al. Population-based study of antibody to the human polyomaviruses BKV and JCV and the simian polyomavirus SV40. *JMedVirol*. 2003;71(1):115-23.
47. Hunt D, Giovannoni G. Natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy: a practical approach to risk profiling and monitoring. *Pract Neurol*. 2012;12(1):25-35.
48. Flaegstad T, Traavik T. Detection of BK virus IgM antibodies by two enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) and a hemagglutination inhibition method. *Journal of medical virology*. 1985;17(2):195-204.
49. Drummond JE, Shah KV, Saral R, Santos GW, Donnenberg AD. BK virus specific humoral and cell mediated immunity in allogeneic bone marrow transplant (BMT) recipients. *Journal of medical virology*. 1987;23(4):331-44.
50. Antonsson A, Green AC, Mallitt KA, O'Rourke PK, Pandeya N, Pawlita M, et al. Prevalence and stability of antibodies to 37 human papillomavirus types--a population-based longitudinal study. *Virology*. 2010;407(1):26-32.

51. Warnke C, Pawlita M, Dehmel T, Posevitz-Fejfar A, Hartung HP, Wiendl H, et al. An assay to quantify species-specific anti-JC virus antibody levels in MS patients. *MultScler*. 2013.
52. Gorelik L, Lerner M, Bixler S, Crossman M, Schlain B, Simon K, et al. Anti-JC virus antibodies: implications for PML risk stratification. *AnnNeurol*. 2010;68(3):295-303.
53. Bozic C, Richman S, Plavina T, Natarajan A, Scanlon JV, Subramanyam M, et al. Anti-John Cunningham virus antibody prevalence in multiple sclerosis patients: baseline results of STRATIFY-1. *AnnNeurol*. 2011;70(5):742-50.
54. Rossi F, Li X, Jacobson L, Levine AJ, Chen Y, Palella FJ, et al. BK virus capsid antibodies are associated with protection against subsequent development of PML in HIV-infected patients. *Virology*. 2015;485:467-72.
55. Yousef S, Planas R, Chakroun K, Hoffmeister-Ullerich S, Binder TM, Eiermann TH, et al. TCR bias and HLA cross-restriction are strategies of human brain-infiltrating JC virus-specific CD4⁺ T cells during viral infection. *Journal of immunology*. 2012;189(7):3618-30.
56. Krymskaya L, Sharma MC, Martinez J, Haq W, Huang EC, Limaye AP, et al. Cross-reactivity of T lymphocytes recognizing a human cytotoxic T-lymphocyte epitope within BK and JC virus VP1 polypeptides. *J Virol*. 2005;79(17):11170-8.
57. Randhawa P, Viscidi R, Carter JJ, Galloway DA, Culp TD, Huang C, et al. Identification of species-specific and cross-reactive epitopes in human polyomavirus capsids using monoclonal antibodies. *The Journal of general virology*. 2009;90(Pt 3):634-9.
58. Sharma MC, Zhou W, Martinez J, Krymskaya L, Srivastava T, Haq W, et al. Cross-reactive CTL recognizing two HLA-A*02-restricted epitopes within the BK virus and JC virus VP1 polypeptides are frequent in immunocompetent individuals. *Virology*. 2006;350(1):128-36.
59. Li J, Melenhorst J, Hensel N, Rezvani K, Sconocchia G, Kilical Y, et al. T-cell responses to peptide fragments of the BK virus T antigen: implications for cross-reactivity of immune response to JC virus. *The Journal of general virology*. 2006;87(Pt 10):2951-60.
60. White MK, Khalili K. Pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy--revisited. *JInfectDis*. 2011;203(5):578-86.
61. Astrom KE, Mancall EL, Richardson EP, Jr. Progressive multifocal leukoencephalopathy; a hitherto unrecognized complication of chronic lymphatic leukaemia and Hodgkin's disease. *Brain*. 1958;81(1):93-111.
62. Van Loy T, Thys K, Tritsmans L, Stuyver LJ. Quasispecies analysis of JC virus DNA present in urine of healthy subjects. *PloS one*. 2013;8(8):e70950.
63. Major EO, Amemiya K, Tornatore CS, Houff SA, Berger JR. Pathogenesis and molecular biology of progressive multifocal leukoencephalopathy, the JC virus-induced demyelinating disease of the human brain. *Clin Microbiol Rev*. 1992;5(1):49-73.
64. Berger JR, Aksamit AJ, Clifford DB, Davis L, Korálnik IJ, Sejvar JJ, et al. PML diagnostic criteria: consensus statement from the AAN Neuroinfectious Disease Section. *Neurology*. 2013;80(15):1430-8.

65. Berger JR, Levy RM, Flomenhoft D, Dobbs M. Predictive factors for prolonged survival in acquired immunodeficiency syndrome-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *Annals of neurology*. 1998;44(3):341-9.
66. Bauer J, Gold R, Adams O, Lassmann H. Progressive multifocal leukoencephalopathy and immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS). *Acta neuropathologica*. 2015;130(6):751-64.
67. Havla J, Warnke, C. Interdisziplinäres Risikomanagement in der Therapie der multiplen Sklerose. *Deutsches Ärzteblatt*. 2016 26.12.2016:879 - 85.
68. Schmedt N, Andersohn F, Garbe E. Signals of progressive multifocal leukoencephalopathy for immunosuppressants: a disproportionality analysis of spontaneous reports within the US Adverse Event Reporting System (AERS). *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. 2012;21(11):1216-20.
69. Miller DH, Khan OA, Sheremata WA, Blumhardt LD, Rice GP, Libonati MA, et al. A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *The New England journal of medicine*. 2003;348(1):15-23.
70. Khatri BO, Man S, Giovannoni G, Koo AP, Lee JC, Tucky B, et al. Effect of plasma exchange in accelerating natalizumab clearance and restoring leukocyte function. *Neurology*. 2009;72(5):402-9.
71. Warnke C, Ramanujam R, Plavina T, Bergstrom T, Goelz S, Subramanyam M, et al. Changes to anti-JCV antibody levels in a Swedish national MS cohort. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2013;84(11):1199-205.
72. Plavina T, Subramanyam M, Bloomgren G, Richman S, Pace A, Lee S, et al. Anti-JC virus antibody levels in serum or plasma further define risk of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *Annals of neurology*. 2014;76(6):802-12.
73. Sundqvist E, Buck D, Warnke C, Albrecht E, Gieger C, Khademi M, et al. JC polyomavirus infection is strongly controlled by human leucocyte antigen class II variants. *PLoS pathogens*. 2014;10(4):e1004084.
74. Ferenczy MW, Marshall LJ, Nelson CD, Atwood WJ, Nath A, Khalili K, et al. Molecular biology, epidemiology, and pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy, the JC virus-induced demyelinating disease of the human brain. *Clin Microbiol Rev*. 2012;25(3):471-506.
75. Sunyaev SR, Lugovskoy A, Simon K, Gorelik L. Adaptive mutations in the JC virus protein capsid are associated with progressive multifocal leukoencephalopathy (PML). *PLoS Genet*. 2009;5(2):e1000368.
76. Ray U, Cinque P, Gerevini S, Longo V, Lazzarin A, Schippling S, et al. JC polyomavirus mutants escape antibody-mediated neutralization. *Science translational medicine*. 2015;7(306):306ra151.
77. Major EO. Progressive multifocal leukoencephalopathy in patients on immunomodulatory therapies. *Annu Rev Med*. 2010;61:35-47.
78. Matsiota-Bernard P, De Truchis P, Gray F, Flament-Saillour M, Voyatzakis E, Nauciel C. JC virus detection in the cerebrospinal fluid of AIDS patients with progressive multifocal leukoencephalopathy and monitoring of the antiviral treatment by a PCR method. *J Med Microbiol*. 1997;46(3):256-9.
79. Moreno S, Miralles P, Diaz MD, Berenguer J, Bernaldo de Quiros JC, Blazquez R, et al. Cytarabine therapy for progressive multifocal leukoencephalopathy in patients

with AIDS. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 1996;23(5):1066-8.

80. Hall CD, Dafni U, Simpson D, Clifford D, Wetherill PE, Cohen B, et al. Failure of cytarabine in progressive multifocal leukoencephalopathy associated with human immunodeficiency virus infection. AIDS Clinical Trials Group 243 Team. *The New England journal of medicine*. 1998;338(19):1345-51.

81. Landi D, De Rossi N, Zagaglia S, Scarpazza C, Prosperini L, Albanese M, et al. No evidence of beneficial effects of plasmapheresis in natalizumab-associated PML. *Neurology*. 2017;88(12):1144-52.

82. Pavlovic D, Patera AC, Nyberg F, Gerber M, Liu M, Progressive Multifocal Leukoencephalopathy C. Progressive multifocal leukoencephalopathy: current treatment options and future perspectives. *Therapeutic advances in neurological disorders*. 2015;8(6):255-73.

83. Warnke C, Wattjes M, Adams O. Progressive multifokale Leukenzephalopathie. *Nervenarzt*. 2016:1300 - 4.

84. Shelburne SA, 3rd, Hamill RJ. The immune reconstitution inflammatory syndrome. *AIDS Rev*. 2003;5(2):67-79.

85. Giacomini PS, Rozenberg A, Metz I, Araujo D, Arbour N, Bar-Or A, et al. Maraviroc and JC virus-associated immune reconstitution inflammatory syndrome. *The New England journal of medicine*. 2014;370(5):486-8.

86. McGuire D, Barhite S, Hollander H, Miles M. JC virus DNA in cerebrospinal fluid of human immunodeficiency virus-infected patients: predictive value for progressive multifocal leukoencephalopathy. *AnnNeurol*. 1995;37(3):395-9.

87. Koralnik IJ, Boden D, Mai VX, Lord CI, Letvin NL. JC virus DNA load in patients with and without progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurology*. 1999;52(2):253-60.

88. Ryschkewitsch C, Jensen P, Hou J, Fahle G, Fischer S, Major EO. Comparison of PCR-southern hybridization and quantitative real-time PCR for the detection of JC and BK viral nucleotide sequences in urine and cerebrospinal fluid. *JVirolMethods*. 2004;121(2):217-21.

89. Caldarelli-Stefano R, Vago L, Omodeo-Zorini E, Mediati M, Losciale L, Nebuloni M, et al. Detection and typing of JC virus in autopsy brains and extraneural organs of AIDS patients and non-immunocompromised individuals. *JNeurovirol*. 1999;5(2):125-33.

90. Vago L, Cinque P, Sala E, Nebuloni M, Caldarelli R, Racca S, et al. JCV-DNA and BKV-DNA in the CNS tissue and CSF of AIDS patients and normal subjects. Study of 41 cases and review of the literature. *JAcquirImmuneDeficSyndrHumRetrovirol*. 1996;12(2):139-46.

91. Frye S, Trebst C, Dittmer U, Petry H, Bodemer M, Hunsmann G, et al. Efficient production of JC virus in SVG cells and the use of purified viral antigens for analysis of specific humoral and cellular immune response. *Journal of virological methods*. 1997;63(1-2):81-92.

92. Sehr P, Zumbach K, Pawlita M. A generic capture ELISA for recombinant proteins fused to glutathione S-transferase: validation for HPV serology. *JImmunolMethods*. 2001;253(1-2):153-62.

93. Sehr P, Muller M, Hopfl R, Widschwendter A, Pawlita M. HPV antibody detection by ELISA with capsid protein L1 fused to glutathione S-transferase. *J Virol Methods*. 2002;106(1):61-70.
94. Knowles WA, Pipkin P, Andrews N, Vyse A, Minor P, Brown DW, et al. Population-based study of antibody to the human polyomaviruses BKV and JCV and the simian polyomavirus SV40. *Journal of medical virology*. 2003;71(1):115-23.
95. Egli A, Infanti L, Dumoulin A, Buser A, Samaridis J, Stebler C, et al. Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors. *The Journal of infectious diseases*. 2009;199(6):837-46.
96. Warnke C, Dehmel T, Posevitz-Fejfar A, Chan A, Berthele A, Schmidt S, et al. Anti-JC-virus antibody prevalence in a German MS cohort. *MultScler*. 2012;18(7):1054-5.
97. Ausubel F M BR, Kingston R E, Moore D D, Seidman J G, Smith J A, Struhl K. *Current protocols in molecular biology*. New York: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience; 1991.
98. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
99. Schafer K, Waterboer T, Rosl F. A capture ELISA for monitoring papillomavirus-induced antibodies in *Mastomys coucha*. *Journal of virological methods*. 2010;163(2):216-21.
100. Ontaneda D, Fox RJ, Gagne Brosseau MS, Stobbe G, Wundes A. Natalizumab-related PML 2 weeks after negative anti-JCV antibody assay. *Neurology*. 2016;87(9):957-8.
101. Reuwer AQ, Heron M, van der Dussen D, Schneider-Hohendorf T, Murk JL. The clinical utility of JC virus antibody index measurements in the context of progressive multifocal leukoencephalopathy. *Acta Neurol Scand*. 2017;136 Suppl 201:37-44.
102. Muftuoglu M, Olson A, Marin D, Ahmed S, Mulanovich V, Tummala S, Ferrajoli A. Allogenic BK Virus-Specific T Cells for Progressive Multifocal Leukencephalopathy. *N Engl J Med* 2018; 379:1443-51

Danksagung

Danken möchte ich an dieser Stelle

Herrn Prof. Dr. Ortwin Adams für die freundliche Übernahme der Betreuung, die Bereitstellung des interessanten Themas und seine wertvollen Ideen und Hinweise.

Priv.-Doz. Dr. Clemens Warnke für die Übernahme der Co-Betreuung sowie seiner wertvollen Ideen und Hinweise

Iris Herrmann, Dr. Sebastian Grund, Harris Charikleia Gkioule für die tolle Arbeitsatmosphäre.

Ole Heidkamp für seine Ideen für das Layout.

Der gesamten Arbeitsgruppe „Schaal“ für die Denkanregungen und stete Unterstützung.

Allen Mitarbeitern der Virologie für die gute Zusammenarbeit.

Meiner Familie, besonders meinen Eltern, dafür, dass sie mich in all den Jahren in jeder Situation unterstützt haben.

Alexander Rettke, Sara Wißkirchen, Eva Gatzlik, Johanna Truse und Sarah Walter für Ihre Unterstützung, Freundschaft und Partnerschaft.