

Aus dem Institut für Virologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Jörg Timm

**Molekulare Analyse des humanen
Polyomavirus JC bei Patienten mit einer Progressiven
Multifokalen Leukenzephalopathie (PML)**

Dissertation

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

vorgelegt von
Charikleia Gkioule

2020

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

gez.:

Dekan: Herr Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. Ortwin Adams

Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Orhan Aktas

Zusammenfassung

Das Thema dieser Arbeit ist die molekulare Analyse des JC Polyomavirus, das zu den 13 bisher bekannten humanen Polyomaviren zählt. Die Erstinfektion mit JC-Virus (JCV) bei dem Menschen findet meist im jungen Alter statt und gilt als asymptomatisch. Nach grippeähnlichen Symptomen persistiert das Virus in den Nieren, im Knochenmark sowie in weiterem Lymphgewebe. Unter Immunsuppression gibt es erhöhte Replikations- und Proliferationsraten dieses Virus, das dann auch in der Peripherie nachgewiesen werden kann und in großen Mengen im Urin ausgeschieden wird. Zu den oben genannten Immunsuppressions-Bedingungen zählt die AIDS-Erkrankung nach Infektion mit HIV und der Erhalt von immunmodulatorischen Medikamenten, insbesondere monoklonalen Antikörpern, die darauf abzielen, den Teil der destruktiven Immunantwort zu blockieren, der für Autoimmunerkrankungen oder andere Erkrankungen verantwortlich ist. Natalizumab, ein moderner monoklonaler Antikörper, der über seine Bindung an das alpha4-Integrin selektiv die Immunüberwachung des Gehirns verändert und deshalb zur Therapie bei Multipler Sklerose eingesetzt wird, ist besonders mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer PML assoziiert. Wenn das JCV in der Peripherie reaktiviert wird, kann es in vielen Fällen im Blut nachgewiesen werden, sein Nachweis im Liquor gelingt in ca. 70-80%. Der Nachweis von JCV DNA aus dem Liquor gilt bei passenden klinischen und MRT-Befunden als beweisend für eine PML. Kennzeichnend sind dabei multifokale Infiltrate der weißen Substanz im Gehirn. Eine direkte Plasmapherese und damit die Entfernung des medikamentösen Effektes von Natalizumab kann die starken neurologischen Defizite einschränken, jedoch ist es möglich, dass ein darauffolgender IRIS (*Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome*) die Prognose trotzdem verschlechtert.

Ein besonderes Interesse bei der Erforschung der PML besteht in der Aufklärung des biologischen Mechanismus, wie sich der JCV-Wildtyp verändert hin zu den Mutanten, wie man sie regelmäßig bei Patienten mit PML im Liquor finden kann. Im Gegensatz zum Archetyp-Virus, der ursprünglich den Organismus hatte, besitzen diese JCV-Mutanten ein verstärktes Replikationspotential und die Fähigkeit, in das Gehirn einzudringen. In der vorliegenden Arbeit werden zwei Regionen im Virusgenom, die durch eine Vielzahl genetischer Modifikationen gekennzeichnet sind, nämlich die VP1-Kapsid-Genregion sowie die nicht kodierende Kontrollregion (NCCR-Gen-Promotor-Region), in Blut- und Liquorproben von Patienten systematisch und molekular analysiert (Ethikvotum Nr. 4992, 24. Februar 2015).

Nach der Erstellung von experimentellen Protokollen und deren Optimierung mit verschiedenen PCR-Methoden (konservativ und ‚*realtime*‘) und anschließender Sequenzierung der Genregionen wurden VP1-PML-Mutationen aus sequentiellen Proben einzelner Patienten analysiert. Dabei wurden Deletionen, Duplikationen und Insertionen der NCCR-Gensegmente, die physiologisch Bindungsstellen für virale Replikations- und Transkriptionsfaktoren darstellen, besonders fokussiert. Die meisten der nachgewiesenen genetischen Veränderungen stimmen mit denen in der Literatur beschriebenen überein, in einzelnen Fällen wurden jedoch neue Mutationen festgestellt, die das bisherige Wissen ergänzen. Ein weiterer Fokus der Arbeit ist die umfangreiche Analyse eines besonderen Falles aus der Hämatologie, bei dem massive JCV-Nachweise im Blut und Liquor interessanterweise nicht mit einer PML einhergingen und dessen JCV-Varianten andere, nicht PML-typische Mutationen aufwiesen. Insbesondere dieser Fall unterstützt die kausale Bedeutung der NCCR und VP1-Mutationen für die Pathogenese der PML.

Summary

The topic of this work includes the molecular analysis of JC Polyomavirus, one of the 13 human polyomaviruses. The initial infection with JCV in humans usually takes place at a young age and is considered asymptomatic. In particular, following the flu-like symptoms of the initial disease, the virus persists in the kidneys, bone marrow and other lymphatic tissue. Under immunosuppression there are increased replication and proliferation rates of the virus, which can be detected in the periphery and excreted in urine in large quantities. Among the above-mentioned immunosuppressive conditions is the AIDS disease after infection with HIV and the use of immunomodulatory drugs, particularly monoclonal antibodies, aimed at paralyzing part of the destructive immune response responsible for autoimmune diseases or other diseases. Natalizumab, a modern monoclonal antibody that selectively alters the immune monitoring of the brain via its binding to alpha4 integrin and is therefore used for the therapy of multiple sclerosis, is associated with an increased risk for the development of PML. If the JCV is reactivated in the periphery, it can be detected in many cases in the blood and its detection in the CSF is successful in about 70-80% in patients with manifested PML and is considered proving for this disease. PML stands for progressive multifocal leukoencephalopathy. Characteristic are multifocal infiltrates of white matter in the brain. Without direct plasmapheresis and thus with the removal of the medicinal effect of natalizumab, PML may be associated with severe neurological deficits, which may be lethal to the patient. Direct plasmapheresis and thus the removal of the drug effect of natalizumab may reduce the severe neurological deficits of PML, however it is possible that a subsequent IRIS (*Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome*) still worsens the prognosis.

Of particular interest in the study of PML is the elucidation of the biological mechanism of how the JCV wild-type changes to the mutants that can be found regularly in patients with PML in the CSF. Unlike the archetype virus that originally infected the organism, these JCV mutants have an increased replication potential and the ability to invade the brain. In the present study, two regions in the viral genome characterized by a variety of genetic modifications, namely the VP1 capsid gene region and the non-coding control region (NCCR gene promoter region), are systematically probed and analyzed at the molecular level in patients' blood and CSF samples (Ethikvotum No. 4992, February 24, 2015).

Following the development of experimental protocols and their optimization with various PCR methods (conservative and 'realtime') followed by sequencing of the genetic regions, VP1-PML mutations were analyzed from sequential samples of individual patients. Deletions, duplications and insertions of the NCCR gene segments, which are physiologically binding sites for viral replication and transcription factors, were particularly focused. Most of the genetic mutations detected are consistent with those described in the literature, but in some cases new mutations have been identified to complement the existing knowledge. Another focus of the work is the extensive analysis of a special case in hematology, in which massive JCV detection in the blood and cerebrospinal fluid was, interestingly, not associated with PML and whose JCV variants had other non-PML mutations. In particular, this case supports the causal significance of NCCR and VP1 mutations for the pathogenesis of PML.

Abkürzungsverzeichnis:

5HT2A	<i>5-Hydroxytryptamin-Rezeptor 2A</i>	EEG:	Elektroenzephalogramm
Å	Ångström	EIA	enzymatisches Immunadsorptionsverfahren
Abbildung	Abb.	EGTA	Ethylenglycol-bis (aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
AS, AA	Aminosäure (<i>Amino acid</i>)	ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ATP	Adenosin 5'triphosphat	E.M.A.	European Medicines Agency
ATG	<i>Anti-Thymocyte Globulin</i>	ERAD	<i>Endoplasmic Reticulum-Associated Protein Degradation</i>
AU	<i>arbitrary unit</i>	FAM	6-Carboxy-Fluorescein
BKV	BK-Virus	GAGs	<i>glycosaminoglycans</i>
BKPyV	BK-Polyoma-Virus	GVHD	<i>Graft versus Host Disease</i>
bp	Basenpaar	H1	Histon 1
CD	<i>Clusters of Differentiation</i>	H2A	Histon 2A
CI	Konfidenzintervall	H2B	Histon 2B
CLL	<i>chronic lymphocytic leukemia</i>	H3	Histon 3
CT	<u>C</u> omputertomographie	H4	Histon 4
Derlin	<i>Degradation in endoplasmic reticulum protein</i>	HAART	hochaktive antiretrovirale Therapie
DMSO	Dimethylsulfoxid	HN	Handelsname
DNA	Desoxyribonuklein-säure	HPOS	hochpositive Kontrolle
DOCK8	<i>Dedicator of Cytokinesis Gene</i>	IgG	Immunglobulin G
dsDNA	<u>D</u> oppelstrang Desoxyribonuklein-säure	IgM	Immunglobulin M
DX1	Messzeitpunkt 2	IL-7	Interleukin 7
DX2	Messzeitpunkt 3	IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
E. coli	<i>Escherichia coli</i>		
ED	Erste Diagnose		
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure		

IRIS	<i>Immune reconstitution syndrome</i>	nm	Nanometer
JCV	JC-Virus	PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
JCPyV	JC-Polyoma-Virus		Polymerase-Kettenreaktion
kBp	Kilobasenpaare	PDA	<i><u>P</u>ancreatic <u>d</u>uctal <u>a</u>denocarcinoma</i>
LB	<i>lysogeny broth</i>	PML	Progressive Multifokale Leukoenzephalopathie
LSQ	Liquor-Serum-Quotient	PML-NBs	<i><u>P</u>romyelocytic-<u>L</u>eukemia <u>N</u>uclear-<u>B</u>odies</i>
LTA_g	<i>Large Tumour Antigen</i>	PP2A	Proteinphosphatase 2A
LPOS	niedrig positive Kontrolle	pRb	<i>retinoblastoma susceptibility gene</i>
LSTc	<i>Lactoseries tetrasaccharide c</i>	qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
MAB	<i><u>M</u>onoclonal <u>A</u>ntibodies</i>	RBL	<i>Rat Basophilic Leukemia cells</i>
miRNA	mikro RNA	Rh	Rhesusfaktor
ml	Milliliter	RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
MPOS	mittlere Kontrolle	RNA	Ribonukleinsäure
mPyV	murinen Polyomaviren	s.	siehe
mRNA	messenger RNA	SAPK	stressaktivierte Proteinkinase
MRT	Magnetresonanztomographie	S-Phase	Synthesephase
MRZ	Masern-Röteln-Zoster-Reaktion	sTA_g	small T Antigen
MS	Multiple Sklerose	SV-40/SV40	<i>Simianvirus 40</i>
NAT	Natalizumab		od. <i>Simian <u>V</u>acuolating <u>V</u>irus 40</i>
NCCR	<i>Non-Coding Control Region</i>	TAMRA	Tetramethyl-rhodamin
ND10	<i>Nuclear domain 10 bodies</i>	T-Antigen	Tumorantigen
NEM	N-Ethylmaleimide	TCR	<i>T-cell receptor</i>
NFI-X	<i>nuclear factor-1 class X</i>		
NFI	<i>nuclear factor I</i>		
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom		
NK-Zellen	natürliche Killerzellen		
NLS	nuclear localization signal		

Tm	<i>Primer melting Temperature</i>	VP1	Virusprotein 1
Tx	Transplantation	VP2	Virusprotein 2
U	Einheiten	VP3	Virusprotein 3
VLA-4	<i>Very Late Antigen– 4</i>	WBC	<i>White Blood Cell</i>
VLPs	<i><u>Virus-Like-Particles</u></i>	Z.n.	Zustand nach
		ZNS	zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung	1
1.1. Polyomaviridae	1
1.1.1. Morphologie:	1
1.1.2. Phylogenie und Evolution	4
1.1.3. Medizinische Bedeutung der humanen Polyomaviren	8
1.2. JC-Virus.....	9
1.2.1. PML und JCV: Die historischen Zusammenhänge.....	9
1.2.2. Morphologie und Genomorganisation	12
1.2.3. Virusproteine:	13
1.2.3.1. Virusprotein 1 (VP1)	13
1.2.3.2. Virusprotein 2 (VP2)	14
1.2.3.3. Virusprotein 3 (VP3)	15
1.2.3.4. Agnoprotein.....	15
1.2.3.5. Großes Tumorantigen (<i>Large Tumour Antigen- LTA_g, T'</i>)	16
1.2.3.6. Kleines Tumor-Antigen (<i>Small Tumour Antigen- sTA_g, t'</i>).....	16
1.2.3.7. Die alternativ gespleißten T-Antigen-Varianten	17
1.2.4. NCCR Region und Varianten.....	17
1.2.4.1. NCCR-Funktion, Varianten und Pathogenität.....	17
1.2.4.2. Bedeutung der Wiederholungen, der Neuaneordnungen (,Rearrangements') und TATA-Boxen	18
1.2.5. Biologie des Virus	20
1.2.5.1. Anbindung an der Zelloberfläche	20
1.2.5.2. Eintritt und intrazelluläre Transport (Trafficking)	21
1.2.5.3. Die Replikation und die Transkription	22
1.2.6. Typen und Subtypen des JCV	25
1.2.6.1. Die Klassifikationssysteme.....	25
1.2.6.2. Die aktuellen JCV-Genotypen	26
1.2.6.3. Die Genotypisierung des JCV und die humane Migration	28
1.2.6.4. Die PML assoziierten JCV-VP1-Varianten	29
1.3. PML: Die Pathogenese	33
1.3.1. JCV Infektion, die Theorie und die Pathogenese-Stadien einer PML	33
1.3.2. Theorien über die Zielorte der Persistenz im Wirt	34
1.3.2.1. Theorien über die Zielorte der Persistenz im Wirt.....	35
1.3.2.2. Harnsystem und Geschlechtsapparat	35

1.3.2.3.	Gehirn	35
1.3.2.4.	Das hämatopoetische System	36
1.3.2.5.	Endothelzellen und Gastrointestinaltrakt	37
1.4.	Epidemiologie des JCV und Immunantwort	37
1.4.1.	Humorale Immunantwort	37
1.4.2.	Zellvermittelte Immunität gegen JCV	39
1.5.	Progressive Multifokale Leukoenzephalopathie (PML)	40
1.5.1.	Die Klinik.....	40
1.5.2.	Die PML-assoziierten Erkrankungen medizinhistorisch gesehen	41
1.5.2.1.	Die frühen Jahre der PML-Historie	41
1.5.2.2.	Die zweite Ära der PML-Historie: AIDS.....	42
1.5.2.3.	Die dritte Ära der PML-Historie: Das Natalizumab und andere immunmodulatorische Therapien	42
1.6.	Immunmodulatorische Therapien und das PML-Risiko.....	43
1.6.1.	Natalizumab. Die Pathogenese der JCV-Reaktivierung unter Natalizumab-Behandlung	43
1.6.2.	Weitere MABs und andere neue Substanzen mit PML-Risiko.....	44
1.6.3.	PML-Erkrankungen bei Immunsystemkrankheiten, Immun-modulatorischen Medikamenten und HIV-Infektionen: Gemeinsamkeiten	49
1.7.	Inzidenz der Erkrankung	50
1.8.	PML: Überlebensraten und Behandlungsmöglichkeiten nach der Diagnosestellung	51
1.8.1.	Antivirale Therapie	52
1.8.2.	Impfstoff.....	53
1.8.2.1.	Aktive Immunisierung.....	53
1.8.2.2.	Passive Immunisierung.....	54
1.9.	Prognose und Mortalität	55
1.10.	Risikostratifizierung von PML im Zusammenhang mit Natalizumab-Gabe	55
1.11.	Fragestellung der vorliegenden Arbeit	56
2.	Materialien und Methoden	58
2.1.	Materialien.....	58
2.1.1.	Patientenproben.....	58
2.1.2.	PCR-Primer.....	59
2.1.2.1.	Sequenzen der verwendeten PCR-Primer	59
2.1.2.2.	Sequenzen der experimentell optimierten Primer.....	62
2.1.3.	Verwendete Polymerasen und PCR Kits	63

2.1.4. Weitere Chemikalien	63
2.1.5. Geräte	64
2.1.6. Kits für die DNA-Extraktion/Reinigung	64
2.1.7. Datenauswertung und Software.....	65
2.2. Methodik der einzelnen Arbeitsschritte.....	66
2.2.1.1. Aufarbeitung der Biopsien aus Hirngewebe und Lymphknoten	66
2.2.1.2. Aufarbeitung der EDTA-Blut-Proben	67
2.2.1.3. Aufarbeitung von Körperflüssigkeiten wie Liquor -, Serum- und Urin-Proben	67
2.2.2. Messung der JCV-Viruslast in der Diagnostik -mittels Multiplex Realtime-PCR.....	67
2.2.3. Thermalprotokolle für die PCR	68
2.2.3.1. JC Virus VP1- und NCCR- Analyse: Optimierung der Methodik.....	68
2.2.3.2. Optimierung des PCR-Thermalprotokolls unter Zusatz eines weiteren Enzyms und einer ‚nested‘-PCR-Runde	74
2.2.4. Aufreinigung der PCR-Produkte.....	80
2.2.4.1. Die Visualisierung und die Auftrennung der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese	80
2.2.4.2. Gelextraktion von DNA Fragmenten	81
2.2.5. Konzentrationsmessung der NCCR- und VP1- PCR-Produkte.....	82
2.2.6. Analyse der VP1-Mutationen.....	82
2.2.7. DNA-Sequenzierung.....	82
2.2.8. JCV-VP1 Struktur-Vorhersage und Modellierung	82
3. Ergebnisse	84
3.1. Die molekulare JCV-DNA Analyse im PML-Patienten-Kollektiv	84
3.1.1. Optimierung des PCR-Thermalprotokolls.....	84
3.1.2. Die Bearbeitung und die Auswertung der Sequenzen	85
3.2. Ein außergewöhnlicher Fall: massiver JCV-Nachweis im Liquor bei Hyper-IgE-Syndrom der Form DOCK8-Defizienz ohne Hinweis auf das Vorliegen einer PML.....	97
3.2.1. Anamnese und klinischer Verlauf des Patienten Nr.21.....	97
3.2.2. JCV-DNA-Nachweise in Liquor, Serum und anderen Körperflüssigkeiten beim Patienten Nr.21.....	100
3.2.3. Genetischer Hintergrund des ‚DOCK-8‘-Defizits	100
3.2.4. Polyomavirus- BK und JC-DNA- Nachweise.....	101
3.2.5. PML-assoziierte Mutationen im VP1 bzw. Rearrangements (NCCR) im Genom des Virus beim Patienten Nr.21	103
3.2.5.1. Sequenzierung des JC- VP1.....	103
3.2.5.2. Sequenzierung des JCV-NCCR.....	105

4. Diskussion	110
4.1. Die Charakterisierung der PML-Sequenzen.....	110
4.1.1. Mutationen im JCV-NCCR	110
4.1.2. Mutationen im JCV-VP1.....	114
4.2. Der Fall des Patienten Nr.21	116
4.2.1. JC-Virus und PML in Zusammenhang mit Hyper-IgE-Syndrom.....	116
4.2.2. Patient Nr.21 im Vergleich zu den Fällen mit manifester PML.....	117
5. Literatur	123
6. Danksagung.....	144

1. Einleitung

1.1. Polyomaviridae

1.1.1. Morphologie:

Polyomaviridae ist eine Virus-Familie, deren natürliche Wirte hauptsächlich Säugetiere und Vögel sind. Die Polyomaviren verdanken ihren Namen dem Charakteristikum des ersten isolierten Mitglieds der Familie, bei der Infektion im Tiermodell mehrere (poly: griechisches Wort für ‚mehr‘) Tumore (-oma) zu induzieren (Gross, 1953).

Die Familie der Polyomaviridae schließt unbehüllte Viren ein, die ein ringförmiges Doppelstrang Desoxyribonukleinsäure-Genom (ds-DNA) mit einer Länge von ca. 5000 bp besitzen. Die reifen sphärischen Viruspartikel besitzen ein ikosaedrisches Kapsid, das eine einzelne Kopie des viralen Genoms umgibt (Moens et al., 2017b) (s. Abb. 1).



Abb. 1: Polyomaviridae-Struktur: Die dreidimensionale (3D) Struktur eines SV40-Partikels bei 3,1 Å - Auflösung wurde mittels Röntgenstrukturanalyse bestimmt (s. Kapitel 2.2.8). Die Pentamere des VP1 sind durch ihre verlängerten C-terminalen Arme miteinander verbunden. Der Durchmesser dieses Virions beträgt etwa 500 Å. (Modifiziert und adaptiert von Proteindatenbank ID 1SVA und (ICTV, 2018; Stehle et al., 1996), reproduziert von RCSB Protein Data Bank (https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/dsdna-viruses/w/polyomaviridae ICTV-Virus-Taxonomy) (ICTV, 2018; Moens et al., 2017a).

Kein bekanntes Polyomavirus verfügt über eine eigene DNA-Polymerase. Für die DNA-Replikation des Virus sind die wirtseigenen Polymerasen erforderlich (Fields et al., 2007) .

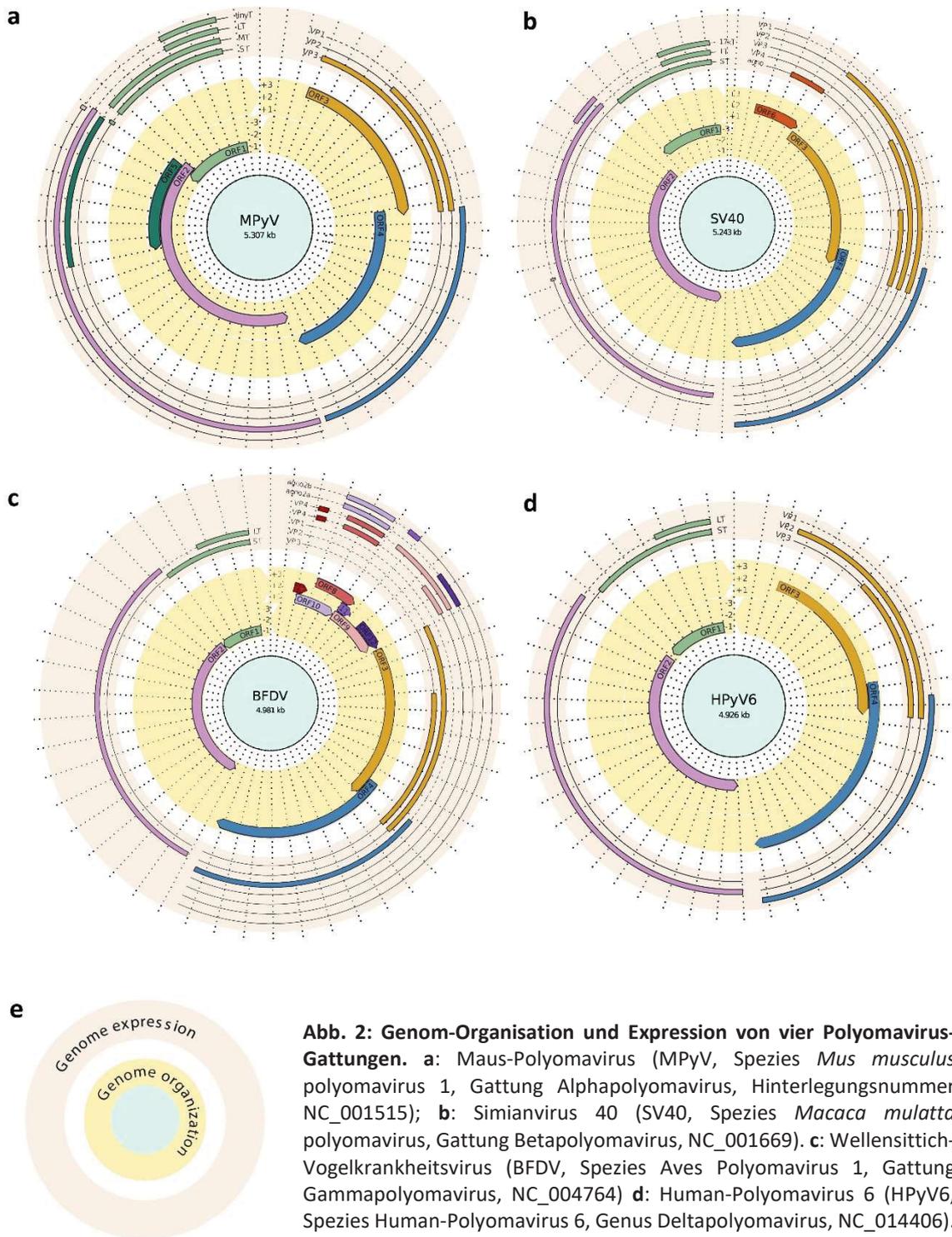


Abb. 2: Genom-Organisation und Expression von vier Polyomavirus-Gattungen. **a:** Maus-Polyomavirus (MPyV, Spezies *Mus musculus* polyomavirus 1, Gattung Alphapolyomavirus, Hinterlegungsnummer NC_001515); **b:** Simianvirus 40 (SV40, Spezies *Macaca mulatta* polyomavirus, Gattung Betapolyomavirus, NC_001669). **c:** Wellensittich-Vogelkrankheitsvirus (BFDV, Spezies *Aves Polyomavirus* 1, Gattung Gammapolyomavirus, NC_004764) **d:** Human-Polyomavirus 6 (HPyV6, Spezies Human-Polyomavirus 6, Genus Deltapolyomavirus, NC_014406).

Bei jedem Gattungsgenom sind zwei kreisförmige Ebenen zu unterscheiden, genauso wie beim Muster-Schema **(e)**. Die innere Schicht stellt die 6 Leserahmen des Genoms dar. Die NCCR-Region befindet sich zwischen dem Beginn des ersten jeweiligen ORF in der frühen Genomregion (ORF3 für MPyV und HPyV6, ORF6 für SV40, ORF7 für APyV1) und dem Beginn des ersten ORF (ORF1) in der späten Genomregion. Die äußere Schicht zeigt gespleißte Transkripte, dessen Exons entsprechend den jeweiligen ORFs gefärbt sind, während nicht translatierte Regionen und Introns als durchgezogene bzw. gestrichelte Linien dargestellt sind. Die Einheiten der radialen Achse sind Kilobasen (kb). Die Abbildung wurde adaptiert und modifiziert nach (Kazem et al., 2016; Moens et al., 2017b, 2017a).

Das zirkuläre Genom aller Polyomaviren weist eine ähnliche genetische Ausstattung auf (s. Abb. 2). Eingeschlossen im Polyomavirusgenom ist die nichtkodierende Kontrollregion (NCCR: *Non Coding Control Region*), die den Replikationsursprung (ORI: *Origin of Replication*) und gleichzeitig weitere Transkriptionskontroll- und Promotor-Bereiche enthält, welche die frühe und späte Transkription regulieren. Das verbleibende Genom wird in die sogenannten ‚frühen‘ und ‚späten‘ Transkriptionsbereichen durch die NCCR geteilt wie im Nachfolgenden beschrieben:

- Der Bereich der frühen Transkription enthält kodierende Sequenzen für die zwei regulatorischen große (LTag: *Large Tumor Antigen*) und kleine T-Antigene (STAg: *Small Tumor Antigen*), die durch überlappendes Spleißen entstehen, so dass das 5'-Ende des RNA-Transkripts immer die gleiche Startsequenz für beide T-Antigene kodiert. Allerdings ist das 3'-Ende der Transkripte unterschiedlich, denn das große T-Antigen-Transkript ist größer als das kleine T-Antigen-Transkript (etwa 80.000 gegenüber 20.000 Daltons). Es wurde eine weitere Sequenz nur in den Nagetierpolyomaviren beschrieben, die für ein zusätzliches mittelgroßes Transkript im selben Bereich kodiert (Cook, 2016).
- Der Bereich der späten Transkription des Genoms in die umgekehrte Richtung kodiert bei allen Polyomaviren für drei strukturellen Kapsidproteine, VP1, VP2 und VP3. Seltener wird bei einigen Polyomaviren ein zusätzliches VP4-Protein beschrieben. Im Fall von BK-Virus (BKV), JC-Virus (JCV) und SV40 kodiert der späte Transkriptionsbereich noch für ein kleines Protein, das sogenannte Agnoprotein, das den Zusammenbau ihrer Kapside erleichtert (Cook, 2016; Fields et al., 2007; Neu et al., 2009).

Die kodierenden Proteine des frühen Transkription-Bereichs ähneln sich miteinander im Gegensatz zu der variablen Proteingruppe des späten Transkription-Bereichs. Fünf einzelne VP1-Proteine interagieren entweder mit einem VP2 oder einem VP3. Auf diese Weise wird ein Kapsomer bzw. Pentamer zusammengebaut. Mehrere Pentamere setzen sich weiterhin zu einem 40- bis 45-nm-Viruskapsid zusammen. Das Kapsid des Virus enthält insgesamt 72 Pentamere (Baker et al., 1989; Cook, 2016; Fields et al., 2007). Das Viruskapsid ist extrem umweltstabil, kann hohe Temperaturen bis 50°C von bis zu einer Stunde widerstehen und ist als ‚nacktes‘ Virus gegen Lipid-Lösungsmittel (Fields et al., 2007) resistent. Das VP1 allein kann in Lösung spontan virusähnliche Partikel (VLPs) bilden. Dabei handelt es sich um

natürlich vorkommende oder synthetisierte Moleküle mit virusähnliche-Struktur, die keine Infektiosität aufweisen, da sie kein genetisches Material enthalten, und einen Durchmesser von bis 60 nm erreichen. Ein rekombinant hergestelltes VP1 kann auch dsDNA-Moleküle von 5-9,4 kbp Länge organisieren und verpacken. Die VLPs scheinen jedoch eine geringere Histon-Menge als die nativen Virionen zu enthalten (Fang et al., 2012; Hurdiss et al., 2016). Es wurde nachgewiesen, dass die Infektiosität der Polyomaviren sehr spezifisch durch die Wechselwirkung zwischen dem VP1-Protein und den terminalen Sialinsäuren auf den Wirtszellmembranen bedingt ist (Neu et al., 2009), während beim JCV zusätzlich der serotonerge Rezeptor der menschlichen Zellen eine wichtige Rolle bei der Anbindung des Virus an den Gliazellen spielt (Cook, 2016) (s. auch Kapitel 1.2.5.1).

1.1.2. Phylogenie und Evolution

Die Polyomaviridae-Familie umfasst unbehüllte dsDNA-Viren, die in einer Vielzahl von Wirten zu persistierenden Infektionen führen. Die bekannten Viren infizieren verschiedene Wirbeltiere wie Neu- und Altweltaffen, Fledermäuse, Pferde, Menschen, Elefanten, Mäuse, Dachse, Seelöwen, unterschiedliche Vögel, Rinder und Fischdelfine (Calvignac-Spencer et al., 2016; Moens et al., 2017b). Diese schnell gewachsene Virusfamilie umfasst nach heutigem Stand 73 Arten, die taxonomisch mit dem phylogenetischen Vergleichskriterium der Aminosäuresequenz des LTA_g in vier Gattungen unterteilt worden sind:

- Alphapolyomavirus,
- Betapolyomavirus,
- Gammapolyomavirus,
- Deltapolyomavirus.

Viele Arten sind noch nicht klassifiziert (Calvignac-Spencer et al., 2016; Moens et al., 2017b, 2017a). Gattungsnamen setzen sich aus griechischen Buchstaben zusammen, gefolgt von der Endung "Polyomavirus", z. B. Alphapolyomavirus. Die griechische Buchstaben werden fortlaufend verwendet (Calvignac-Spencer et al., 2016).

Die Gattung Gammapolyomavirus, früher genannt ‚Avipolyomavirus-Gruppe‘, schließt sieben Vögel-Spezies ein, während die Gattungen Alpha-, Beta-, und Deltapolyomavirus aus Polyomavirus-Mitgliedern bestehen, die Säugetier infizieren (Calvignac-Spencer et al., 2016; Moens et al., 2017a). Die gestiegene und schnelle Entdeckung von neuen Polyomavirus-Spezies liegt hauptsächlich an den fortgeschrittenen Techniken, wie der

Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit degenerierten Primern, dem ‚Rolling-Circle‘-Replikationsmechanismus und der „Next Generation“-Sequenzierung (Moens et al., 2017b). Diese Methoden erleichterten ihre Identifizierung in verschiedenen Wirten und vor allem enthüllten sie verschiedene Hypothesen über die Polyomavirus-Evolution, wie die evolutionäre Entwicklung der Polyomaviren zusammen mit ihren Wirten. Mittels molekularer Techniken wurden der mögliche Wirtswechsel, die Verdopplung der Abstammungslinien in einem Wirt und die Virus-Rekombination über die Jahren aufgeklärt (Moens et al., 2017b).

Die Polyomaviren haben eine eingeschränkte Wirtsspezifität. Dies könnte darauf hindeuten, dass die nachgewiesene Ko-Divergenz mit ihren Wirten, nämlich der evolutionäre Prozess, bei dem eine Viruspopulation parallel mit Ihren Wirten in zwei oder mehr Nachkommen-Arten divergiert, ein wichtiger Faktor bei der Polyomavirus-Diversifikation auf der Erde war. Molekularbiologisch gesehen beträgt der langfristige Evolutionsrhythmus der nicht strukturbildenden Polyomavirus-Proteine 10^{-8} Substitutionen per Position im Jahr. Diese Schätzung ist interessant, denn einen so langsamen Evolutionsrhythmus stellen mittlerweile die jeweilige Wirte selbst mit 10^{-9} per Stelle im Jahr (Buck et al., 2016; Moens et al., 2017b). Das spricht für ein besonderes Model einer möglichen parallelen Virus-Wirt-Entwicklung. Im Gegensatz dazu weichen die kurzfristigen Substitutionsraten für einzelne Polyomavirusstämme stark davon ab. (Kitchen et al., 2008; Moens et al., 2017b). Das strikte Ko-Divergenz-Virus-Wirt-Szenario konnte bisher jedoch kein familienweites Muster der Diversität definieren. Das betont den wichtigen Beitrag anderer Evolutionsverfahren wie der Abstammungslinien-Verdopplung und der Rekombination (Moens et al., 2017b).

Der Vergleich von Proteinamino-säure-Sequenzen über die Polyomavirusstämme zeigte eine variable Homologie von 50 bis 80% in Abhängigkeit von dem untersuchten Protein. Bei der Polyomavirus-Evolution haben die DNA-Rekombinationsereignisse des frühen als auch des späten Bereichs der Transkription eine besondere Rolle gespielt. Darüber hinaus sind unterschiedliche Substitutionsraten für das LTag und die Kapsidproteine der Polyomaviren beobachtet worden. Das könnte einerseits an dem Selektionsdruck auf das Kapsid seitens der Immunantwort liegen und andererseits an der Notwendigkeit einer Interaktion des LTag mit den Wirt-Zell-Faktoren bei der Transkription und der Replikation (Calvignac-Spencer et al., 2016; Moens et al., 2017b).

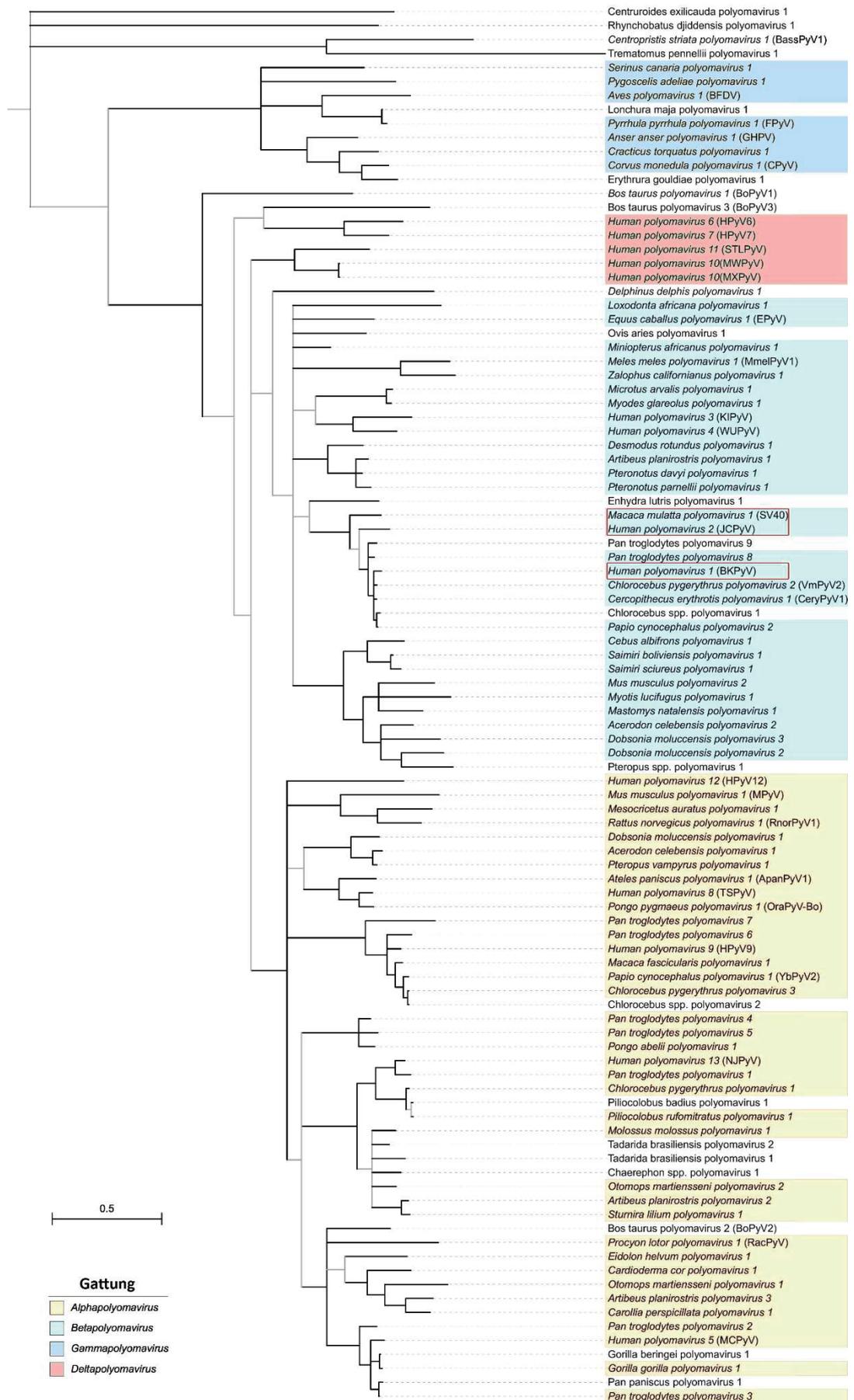


Abb. 3: Die phylogenetischen und evolutionären Beziehungen der Polyomaviren basierend auf dem konservierten Bereich des LTA_g-Proteins: die schwachen Knoten (Shimodaira-Hasegawa-like approximate

likelihood Ratio test (SH-like aLRT) $<0,90$) wurden gelöscht und die Knoten mittlerer Stärke sind mit grau markiert (SH-like aLRT values $<0,95$). Adaptiert und modifiziert aus (Moens et al., 2017b).

Folglich ist abhängig von dem jeweiligen phylogenetischen Baum (LTag-Baum oder VP1-Baum) von einer unterschiedlichen Verwandtschaft bei Polyomaviren auszugehen (Buck et al., 2016; Moens et al., 2017b), denn laut Carr und Kollegen sind die DNA-Rekombinations-Ereignisse nicht zufällig im Genom verteilt. Konkreter sind die Grenzen der VP1-Genomregion im Allgemeinen als ‚Hotspots‘ mit einer hohen Rekombinationsrate zu sehen, wobei eine sehr niedrige oder kaum nachweisbare Evidenz einer Rekombination bei der LTag-Genregion nachgewiesen wurde. Diese sogenannte konservative Rekombinations-‚Coldspot‘-Region macht zusammen mit der einfachen Beschreibung des bestimmten Baums diese Genregion ideal für die phylogenetische Abbildung der Polyomaviren (Carr et al., 2017) (s. Abb. 3).

Ursprünglich wurden die Polyomaviren als Mitglieder der Papovavirus-Familie klassifiziert. Inzwischen gilt die Bezeichnung ‚Papovavirus‘ -Familie, die sich aus Papillomaviren-, Polyomaviren - und SV40 zusammensetzte, nicht mehr. Die Polyomaviren wurden von den Papillomaviren im Jahr 2000 abgetrennt und anschließend als eigene Familien eingeführt. (Fields et al., 2013). Der Schwachpunkt der ursprünglichen Polyomaviruseinteilungen war unter anderem, dass sie auf der Untersuchung unterschiedlicher Gene basierte (Calvignac-Spencer et al., 2016). Im Jahr 2015 wurde aus diesem Grund durch das Internationale Komitee zur Taxonomie von Viren (ICTV, *International Committee on Taxonomy of Viruses*) die neue, standardisierte Nomenklatur eingeführt und im Jahr 2016 aktualisiert (Calvignac-Spencer et al., 2016; Moens et al., 2017a). Gemäß dieser Einteilung gehören das JCV, das SV-40 und das BKV, zusammen mit anderen Virusarten zu den Betapolyomaviren, wie weiteroben beschrieben wurde (s. Abb. 3).

Abschließend soll die enge bekannte Verwandtschaft mit den Papillomaviren und weiterhin ihre gemeinsame ss-DNA-Viren-Abstammung erläutert werden: Beide Virusfamilien zeigen Ähnlichkeiten in der Morphologie und in ihren genomischen Eigenschaften (‚früher‘ und ‚später‘ Genbereich der Transkription und chromosomale Struktur). Der Vergleich des Kapsids, der Replikationsproteine und vor allem der inaktiven enzymatischen Eigenschaft der LTag-Proteindomäne deutet darauf hin, dass beide Virus-Familien sich direkt von den ss-DNA-Viren entwickelt haben. Ein Beispiel dafür seien die ss-DNA-Viren: Nanoviren, Parvoviren und Geminiviren (Koonin et al., 2015; Moens et al., 2017b). Zusätzlich wird diese

Evolutionstheorie durch die inaktive enzymatische ‚Rollender-Ring-Typ‘-Endonuklease Eigenschaft der LTA_g-Proteindomäne gestützt: das Umschalten des Replikation-Typs von dem ‚Rollender-Ring‘-Typ der ss-DNA-Viren auf dem ‚theta‘-ähnlichen-Typ der ds-DNA-Viren stärkt besonders diese Theorie. (Moens et al., 2017b).

1.1.3. Medizinische Bedeutung der humanen Polyomaviren

Die Polyomaviren können bei Menschen und Tieren darunter Vögeln und Säugetieren, hauptsächlich nicht-maligne, seltener aber auch maligne Erkrankungen verursachen. Bei niederen Wirbeltieren wurden sie bisher mit keinen Krankheiten in Verbindung gebracht (Fields et al., 2013). Die humanen Krankheiten, die von den Polyomaviren hervorgerufen werden, entstehen nach lytischer Infektion bzw. Apoptose der Zielzellen. Das trifft auf die PML als symptomatische JCV-Infektion des Gehirns (Major, 2010), ebenso wie auf die BKV-assoziierte Nephropathie. Es gibt keine Evidenz, dass die initiale oder die primäre Infektion direkt die dazugehörige Krankheit zur Folge hat (Fields et al., 2013). Dennoch ist die asymptomatische Reaktivierung von JCV und BKV gut dokumentiert und wird bis auf 56% bzw. 27% bei immunkompetenten Individuen geschätzt. Interessanterweise scheiden 3,2% der gesunden schwangeren Frauen im 2. und 3. Trimester beide Viren im Urin aus (Cook, 2016). Für diese aktive asymptomatische Virusphase im Körper, auch als Persistenz-Phase bekannt, sind nicht pathologische Viruslasten kennzeichnend. Allerdings ist es möglich, unter bestimmten Umständen einer Immunsuppression, wie bei dem HIV1-assoziierten AIDS, Solid-Organ-Transplantationen bzw. Gabe von Immunsuppressiva, extreme ansteigende Viruslasten zu beobachten, die zur Destruktion der infizierten Zellen führen (Fields et al., 2013).

Bei immunsupprimierten Personen kann auf diese Weise die Reaktivierung des Polyomavirus BKV zu schweren Erkrankungen des Urogenitaltrakts mit häufiger Entwicklung einer Hämorrhagischen Zystitis und zur BKV-assoziierten-Nephropathie führen, während die JCV-Reaktivierung vorwiegend die Progressive Multifokale Leukenzephalopathie (PML) auslösen kann. Das Merkel-Zellpolyomavirus ist das einzige humanpathogene Polyomavirus, das mit reiner Malignität assoziiert ist (Moens et al., 2017b) (s. Tabelle 1). Es ist für die Entwicklung eines bösartigen neuroendokrinen Hauttumors bei Patienten mit bereits bestehender Immunsuppression und vorheriger UV-

Aussetzung bei Älteren verantwortlich (Cook, 2016). Darüber hinaus gibt es auch Hinweise, dass das SV40 mit der Entwicklung von Mesotheliomen und Hirntumoren assoziiert ist (Moens et al., 2017b). Über die letzten 10 Jahre wuchs die Zahl der humanen Polyomaviren auf 13 (Cook, 2016) (s. Tabelle 1).

Virus	Virus Vollname	Seroprävalenz	Entdeckungsjahr	Material der Isolation	Genomlänge (bp)	Erkrankung
HPyV1 (BKPyV)	BK-Polyomavirus	55-90 %	1971 (Gardner et al., 1971)	Urin	5153	·BK-assoziierte Nephropathie, ·Hämorrhagische Zystitis, ·Ureterstenose, ·PML, ·Meningitis u. Enzephalitis, ·Retinitis, ·Pneumonitis, ·Prostatakrebs, ·Immunschwächevirus-assoziierte Speicheldrüsenerkrankung
HPyV2 (JCPyV)	JC-Polyomavirus	44-90 %	1971 (Padgett et al., 1971)	Urin, Gehirn	5130	·Progressive multifocale Leukenzephalopathie (PML), ·Kolon-Karzinom
HPyV3 (KIPyV)	Karolinska Institut Polyomavirus	55-91 %	2007 (Allander et al., 2007)	Nasopharyngealgewebe	5040	Respiratorische Erkrankung
HPyV4 (WUPyV)	Washington University Polyomavirus	69-98 %	2007 (Gaynor et al., 2007)	Nasopharyngealgewebe	5229	Respiratorische Erkrankung
HPyV5 (MCPyV)	Merkel Cell Polyomavirus	58-96 %	2008 (Feng et al., 2008)	Haut Läsionen	5387	Merkel-Zell-Karzinom
HPyV6	Human Polyomavirus 6	67-98 %	2010 (Schowalter et al., 2010)	Haut	4926	·Keratoakanthom, ·Kimura Erkrankung
HPyV7	Human Polyomavirus 7	35-86 %	2010 (Ho et al., 2015; Schowalter et al., 2010)	Haut	4952	Pruritischer Hautausschlag
HPyV8 (TSPyV)	Trichodysplasia spinulosa-assoziiertes Polyomavirus	70-84 %	2010 (Van der Meijden et al., 2010)	Haut Läsionen	5232	Trichodysplasia spinulosa
HPyV9	Human Polyomavirus 9	20-70 %	2011 (Scuda et al., 2011)	Blut, Haut, Urin	5026	Unbekannt
HPyV10 (MWPyV)	Malawi Polyomavirus	42-99%	2012 (Buck et al., 2012)	Stuhl	4927	Unbekannt
HPyV11 (STLPyV)	St Louis Polyomavirus	68-70%	2012 (Lim et al., 2013)	Stuhl	4776	Unbekannt
HPyV12	Human Polyomavirus 12	23-33%	2013 (Korup et al., 2013)	Leber, Blinddarm, Enddarm, Stuhl	5033	Unbekannt
HPyV13 (NJPyV)	New Jersey Polyomavirus	nicht definiert	2014 (Mishra et al., 2014)	Muskeln	5108	Muskel- u. Augenschäden

Tabelle 1: Die bisher nachgewiesenen humanen Polyomaviren, die damit zusammenhängenden Erkrankungen und die Seroprävalenz im gesunden Erwachsenenalter (Allander et al., 2007; Assetta and Atwood, 2017; Buck et al., 2012; Feng et al., 2008; Gardner et al., 1971; Gaynor et al., 2007; Ho et al., 2015; Korup et al., 2013; Lim et al., 2013; Mishra et al., 2014; Moens et al., 2017b; Padgett et al., 1971; Schowalter et al., 2010; Scuda et al., 2011; van der Meijden et al., 2010). [Adaptiert und modifiziert von: (Assetta and Atwood, 2017; Cook, 2016; Moens et al., 2017b)].

1.2. JC-Virus

1.2.1. PML und JCV: Die historischen Zusammenhänge

Die Geschichte der allgemeinen Polyomavirus-Forschung fing in den 1950er Jahren an, als Ludwig Gross nach der Injektion von Maus-Leukämie-Virus in Mäusen Tumoren der Speicheldrüsen und der Glandula Parotis anstatt Leukämie bei den Empfängern

dokumentieren konnte. Dieses Virus ist in der Literatur unter dem Namen MPyV (*Mouse Polyoma Virus*) bekannt (Fields et al., 2013). Im Anschluss wurden weitere Mitglieder der Polyomavirus-Familie entdeckt: das MPtV (*Murine pneumotropic Virus*, auch als ‚K-Virus‘ benannt) und in der Folge das Simian-Virus-40 (SV40). Seitdem wurden viele Polyomaviren entdeckt, darunter auch die ersten humanen Polyomaviren (JCV und BKV im Jahr 1971) (Fields et al., 2013). Weiter unten wird dieser Aspekt in der historischen Entdeckung von JCV im Rahmen der Progressiven multifokalen Leukenzephalopathie vertieft.

Die PML ist bisher die einzige demyelinisierende Erkrankung des menschlichen Gehirns unter Umständen einer Immunsuppression, bei der die Grundlage für die neurologische Störung ein charakterisierter Erreger ist, nämlich das humane JCV (Cook, 2016; Ferenczy et al., 2012; Fields et al., 2013; Major et al., 1992). Erstmals wurde der Begriff PML im Jahr 1958 verwendet, um eine umfangreiche Demyelinisierung im Zusammenhang mit chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) und Hodgkin-Lymphom (Aström, KE; Mancall, EL; Richardson, 1958; Major et al., 1992) zu beschreiben. Zuvor gab es bereits im Jahr 1930 Berichte einer ähnlichen Pathologie und Klinik bei Demenzpatienten (Hallervoderden, 1930; Major et al., 1992). Später in den Jahren 1961 und 1965 wurden neue mögliche PML-Fälle beschrieben (Richardson, 1961). Die Hirnbiopsien der beschriebenen Patienten zeigten die Entwicklung von variablen Demyelinisierungen (Plaques) der weißen Substanz in den Großhirnhemisphären, der Basalganglien und des Thalamus, des Zerebellums und des Hirnstamms. Die Ursache dieser Läsionen konnte jedoch zunächst nicht geklärt werden (Major et al., 1992).

Die erste Hypothese, dass ein Virus an der Pathogenese von PML beteiligt sein könnte, kam bereits im Jahr 1959 auf (Cavanagh et al., 1959; Major et al., 1992), als distinkte Einschlusskörper in den Kernen von den beschädigten Oligodendrozyten eines Patienten mikroskopisch nachgewiesen wurden. Die darauffolgenden Versuche, das verdächtige Virus zu isolieren, gelangen bis zum Jahr 1971 nicht. Als 1971 Hirngewebe von einem Patienten mit PML in Gliazellen Langzeit-fetaler-Hirngewebekulturen verimpft wurde, gelang die erste JCV-Virusisolierung (Padgett et al., 1971). Konkret handelte es um einen 38-jährigen Patienten mit den Initialen J.C., der seit 8 Jahren an einer Hodgkin-Krankheit litt. Der Patient entwickelte im April 1970 eine progressive zentrale Gesichtslähmung links mit begleitender linker Hypoglossusparese und Lähmung der linken oberen Extremität

(Major et al., 1992; Padgett et al., 1977, 1971). Aufgrund der pathognomonischen Oligodendrozyten entlang von demyelinisierenden Läsionen in seiner Hirnbiopsie wurde im Mai 1970 die PML-Diagnose gestellt (Major et al., 1992; Padgett et al., 1971) (s. Abb. 4).

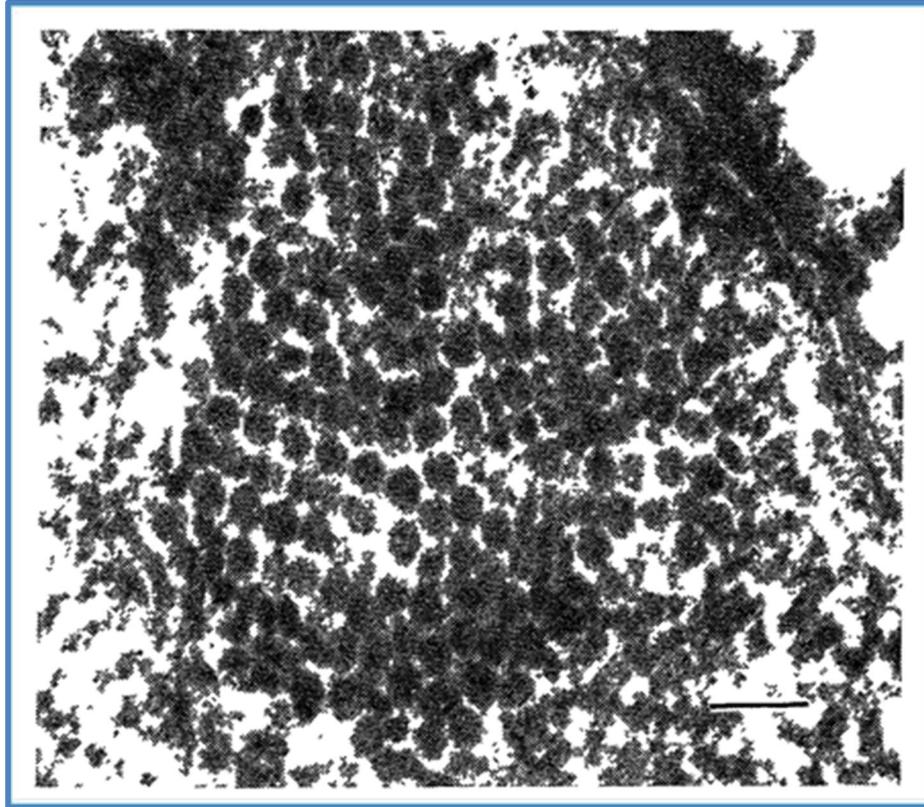


Abb. 4: Ultradünner Schnitt des Glialkerns des Gehirns des PML-Patienten mit den Initialen J.C. mit fokal kristalloidem Virionen-Aggregat. (x 85.000. Der Balken entspricht 100 nm.) Modifiziert von (Padgett et al., 1971).

Die Blutprobe, die einen Monat vor dem Tod entnommen wurde, wies keine Antikörper gegen bis dahin bekannte humane Viren auf und der Patient starb im Juli 1970. Aus seinen Namensinitialen (J.C.) erfolgte die Benennung des verantwortlichen Virus (Padgett et al., 1971).

In den folgenden Experimenten wies das entdeckte JC-Virus eine ähnliche Größe und Gestalt wie die bereits bekannte SV40 Subgruppe der Papovaviren auf und konnte darunter klassifiziert werden (Padgett et al., 1977).

Interessanterweise wurde parallel zu dieser Entdeckung eine identische Virus-Architektur bei einem immunsupprimierten Patienten nach einer Nierentransplantation beschrieben

(Gardner et al., 1971; Major et al., 1992). Beide Viren wurden nach den Initialen des jeweiligen Patienten benannt (J.C. und B.K.) und waren in den Urin-Proben der Patienten nachzuweisen. Allerdings war das BKV häufiger in Urinproben nachweisbar, wobei es nie in Gehirnmaterial bzw. im Liquor nachgewiesen wurde (Arthur et al., 1988, 1985; Lecatsas et al., 1973; Major et al., 1992). Dieser Unterschied stellte die gleiche Identität der Viren in Frage. Eine zusätzliche gemeinsame Eigenschaft beider Viren ist die Hämagglutination von humanen Typ-0-Erythrozyten. Diese Eigenschaft trug Mitte der 70er-Jahre aufgrund von verschiedenen Hämagglutinationshemmtesten zu ihrer getrennten Definition als unterschiedliche Viren bei. Dennoch gehören sie, wie oben ausgeführt, zu der gleichen Virus-Familie (s. Kapitel 1.1.2.) (Gardner, 1973; Gardner et al., 1984; Major et al., 1992; Padgett et al., 1977; Padgett and Walker, 1973).

1.2.2. Morphologie und Genomorganisation

Das JCV hat einen Durchmesser von etwa 45-50 nm. Es ist unbehüllt und besitzt ein ikosaedrisches Kapsid. Dieses Kapsid und das eingeschlossene zirkuläre Doppelstrang DNA-Genom sind typisch für die Polyomavirus Familie (s. Kapitel 1.1.1.) (Fields et al., 2013).

Das Genom des Virus ist mit den zellulären Histonen H2A, H2B, H3 und H4 der Wirtszelle verpackt und formiert ca.25 Nukleosomen. Das Histon H1 fehlt in dieser Struktur und bindet sich an das JCV-Genom direkt nach der Infektion der Zelle (Ferenczy et al., 2012; Fields et al., 2013).

Das JCV-Prototyp-Genom hat eine Länge von 5.130 bp (Cook, 2016) und wird in frühe und späte Genbereiche der Transkription aufgeteilt, die durch eine nicht kodierende Kontrolle-Region (NCCR) voneinander getrennt sind (Assetta and Atwood, 2017). Die NCCR wird als der bestimmende Faktor für die Virus-Zell-Spezifität mit hoch-konservierten flankierenden Sequenzen angesehen, die an die Transkriptions-Startstellen der frühen und späten Bereiche der Transkription grenzen und wichtige zentrale Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren beinhalten (Ferenczy et al., 2012). Zusätzlich weist die NCCR eine breite Sequenz-Homologie zu den entsprechenden Sequenzen anderer Polyomaviren, wie dem BK und dem SV40, auf. Weiter unten werden die natürlich vorkommende NCCR Varianten beschrieben (s.Kapitel 1.2.4: NCCR Region und Varianten).

Die frühen und späten Transkriptionsbereiche werden in entgegengesetzter Richtung von

den komplementären DNA-Strängen transkribiert (Assetta and Atwood, 2017). Der frühe Bereich wird direkt nach der Infektion und vor der DNA-Replikation exprimiert. Er wird gegen den Uhrzeigersinn von der NCCR transkribiert und kodiert für 5 Proteine, nämlich das große T und seine unterschiedlichen Spleißvarianten: das kleine T, T'135, T'136, T'165 (Ferenczy et al., 2012). Die Transkription des späten Bereichs findet gleichzeitig mit der DNA-Replikation und im Uhrzeigersinn an dem anderen DNA-Strand statt. Die Produkte der ‚späten Transkription‘ sind die 3 strukturellen Proteine VP1, VP2, VP3 und das nicht-strukturelle Agnoprotein (Ferenczy et al., 2012).

1.2.3. Virusproteine:

Die drei viral-kodierten Proteinen VP1, VP2, VP3 nutzen denselben ORF im Genom (Fields et al., 2013) (s. Kapitel 1.2.2), dennoch ist nur das VP1-Molekül auf der Oberfläche des Kapsids exponiert. Der C-Terminus jedes VP1-Moleküls ragt aus dem Pentamer heraus und verbindet sich mit dem benachbarten Pentamer, welche durch die Anwesenheit von Disulfidbrücken und Calcium-Ionen stabilisiert werden. Alle diese gemeinsamen Kontakte tragen zur der flexiblen ikosaedrischen Struktur des Kapsids bei. (Ferenczy et al., 2012; Fields et al., 2013).

1.2.3.1. Virusprotein 1 (VP1)

Die Hauptkomponente des Kapsids ist das virale Protein 1 (VP1). Im Genom ist sein Gen am 3'-Ende des späten Bereich der Transkription (Nukleotide 1469-2533) lokalisiert (Ferenczy et al., 2012). Das VP1 ist verantwortlich für die Bindung des Virus an die Wirtszelle und initiiert dadurch die Infektion. Eine alpha-2,6-verknüpfte Sialinsäure (LSTc) auf der Wirtszell-Membran dient als der dominante VP1-Ligand und bindet sich an die Oberseite des JCV-VP1-Pentamers auf der äußeren Oberfläche des Virions (Ferenczy et al., 2012; Neu et al., 2010a) (s. Abb. 5).

Beim Vorgang der Zellanheftung durch ein ganzes Virion können jedoch alle fünf Bindungsstellen an einem Pentamer durch LSTc besetzt werden. Die 3D-Struktur der Bindungsstelle besteht aus den Aminosäuren (AS) der BC-, DE- und HI-Schleifen (*Loops*) eines Monomers und der BC-Schleife eines im Pentamer-benachbarten VP1 (s. Abb. 5) (Neu

et al., 2010a). Tiefer im Detail zeigen die Daten, dass die Sialinsäure-Bindungstasche auf dem JCV-VP1 in einer tiefen „Rille“ liegt, die durch die HI- und BC-Schleifen gebildet wird (Elphick et al., 2004).

Die Schleifen BC (AS: 57-90), DE (AS: 127-148) und HI (AS: 268-278) des VP1-Polypeptids wurden erstmals an der Kristallstruktur des VP1 bei Polyomavirus- und SV40-Komplexen definiert (Liddington et al., 1991) und bestätigten sich als die wechselwirkenden Domänen auf der äußeren Oberfläche (Chang et al., 1996).

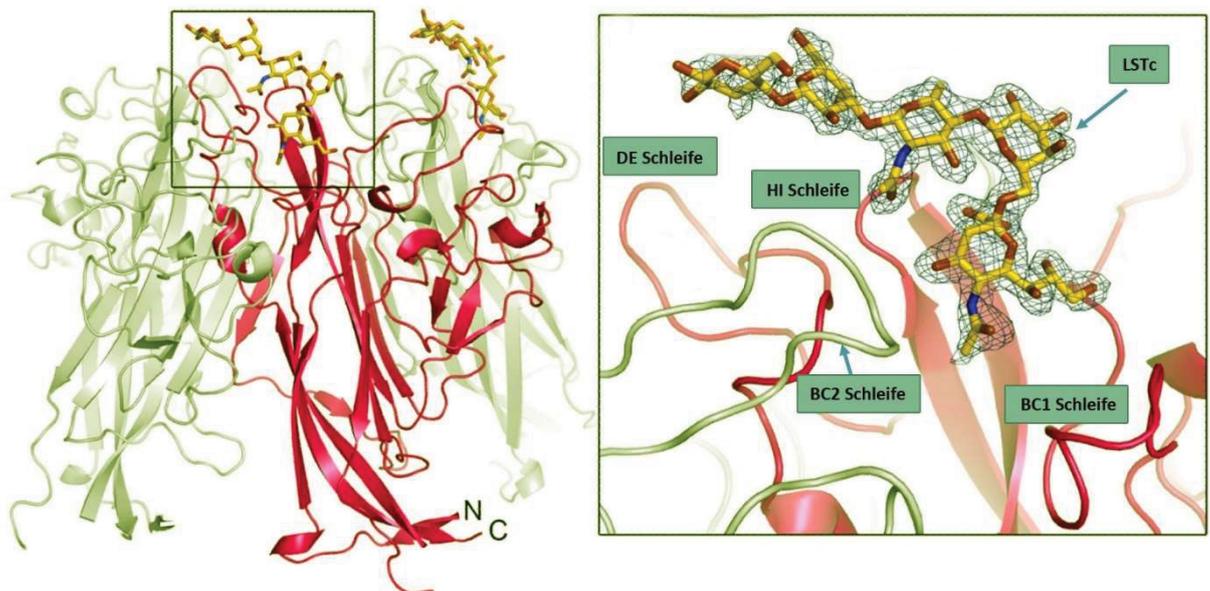


Abb. 5: Graphische Darstellung des VP1-Pentamers (links) und der Bindungsstelle von dem VP1-Monomer an dem LSTc (rechts, und links innerhalb des Quadrats). Adaptiert und modifiziert von Neu et al. 2010 (Neu et al., 2010a).

1.2.3.2. Virusprotein 2 (VP2)

Die Virusproteine VP2 und VP3 repräsentieren zusammen 30% des totalen Proteinanteils des Virus und ihre ORFs befinden sich zwischen dem 3' Terminus des Agnoprotein-ORFs und dem 5'-Ende von VP1. Ein Kapsomer bzw. Pentamer besteht aus fünf VP1-Molekülen und einem VP2 oder VP3 (Fields et al., 2013).

Das VP2 ist ein 344-AS-Protein mit einem ORF zwischen den Nukleotiden 526 und 1560 (Ferenczy et al., 2012). Es gehört zum inneren Teil des Viruskapsids und ist an seinem Aminoterminus mit Myristinsäure modifiziert. Diese Sequenz ist entscheidend für eine effiziente Infektion und kann eine Rolle bei der Penetration von Wirtszellmembranen

spielen (Haley and Atwood, 2017). In einer Studie über die DNA-Bindungskapazität des JC-VP2 wurde gezeigt, dass die letzten 13 AS, vor allem Lysin 332 und Lysin 336, innerhalb der DNA-Bindungsdomäne des VP2 sehr bedeutsam sind (Bhattacharjee and Chattaraj, 2017).

1.2.3.3. Virusprotein 3 (VP3)

Das Virusprotein 3 (VP3) besteht aus den C-terminalen 225 AS von VP2, wobei das ORF beim Nukleotid 883 beginnt und somit den 3'-Terminus von VP2 nutzt. Das heißt, dass das VP3 im gleichen offenen Leserahmen wie VP2 translatiert wird, aber es verwendet ein alternatives AUG-Start-Kodon nach dem VP2-Startcodon (*'downstream'*) und teilt sich die folgenden Aminosäuren mit dem VP2 (Ferenczy et al., 2012).

Das VP2 wie auch das VP3 sammelt sich in der Abwesenheit von VP1 im Zellkern für den anschließenden Zusammenbau des Virus nicht an, sondern sie benötigen das VP1 und weitere Protein-Komplexe für den Nukleartransport. (Fields et al., 2013)

1.2.3.4. Agnoprotein

Das kleinste Protein, Agnoprotein, hat einen kurzen ORF, der für 71 Aminosäuren kodiert. Das Agnoprotein ist ein nicht-strukturelles Protein, das in der späten Gen-Region in einigen Polyomaviren, darunter beim JCV, SV40 und BKV, kodiert wird. Beginnend bei Nukleotid 277 und endend bei Nukleotid 492 (Ferenczy et al., 2012) befindet sich das Agnoprotein in den perinukleären Regionen im Zytoplasma und manchmal auch im Zellkern (Atwood et al 2017). Es wurde vorgeschlagen, dass es als ein Viroporin dient (Suzuki et al., 2010), während es zusätzlich mit dem großen T-Antigen interagiert, um die virale DNA-Replikation zu verringern (Ferenczy et al., 2012). Parallel dazu hat es sich als entscheidend für die virale Genexpression, die Replikation und die Freisetzung des Virus als auch für die DNA-Reparaturwege der Wirtszelle erwiesen. (Assetta and Atwood, 2017; Bhattacharjee and Chattaraj, 2017; Khalili et al., 2005). Es wird in der späten Phase des JCV-Lebenszyklus exprimiert.

Die restlichen auf der DNA kodierten Proteine werden nur während der Replikation des Virus in der Wirtszelle gebildet. Sie besitzen unterschiedliche und essentielle Funktionen in dem Vermehrungszyklus (Fields et al., 2013). Im Folgenden werden sie detailliert

charakterisiert.

1.2.3.5. Großes Tumorantigen (*Large Tumour Antigen- LTag, ,T'*)

Das *Large Tumour Antigen* -LTag ist ein nukleares Phosphoprotein von 700 Aminosäuren Länge (Fields et al., 2013). Das LTag reguliert sowohl die virale DNA-Replikation, die virale frühe Gentranskription, als auch den Transkriptionswechsel von dem frühen zum späten Genbereich (Ferenczy et al., 2012). Die Kristallographie des Proteins weist wichtige funktionelle Domänen auf, unter anderem am N-Terminus die DnaJ-Domäne und am C-Terminus die Retinoblastom- Proteinbindungs-Domäne, die DNA-bindende Domäne - bekannt auch als ‚Origin‘-bzw.-ORI- Bindungsdomäne- und eine zentrale Domäne, bestehend aus den Aminosäuren 251-627 mit Helikase-, Adenosintriphosphatase (ATPase)-Funktion und Hexamer-Struktur, womit die virale DNA-Replikation gestartet wird (Li et al., 2003).

Es wurde auch gezeigt, dass das LTag ein Doppelhexamer in Kopf-Kopf-Anordnung bei der Anheftung am ORI bildet. Die Helikase-Domäne kann an verschiedene zelluläre Proteine binden, zu denen auch das p53 gehört (Lane and Crawford, 1979). Die Bindung an das p53 führt zur einer Hemmung der ‚*downstream*‘ Funktionen, wie dem Wachstumsstillstand und der Apoptose (Assetta and Atwood, 2017). Kleinere funktionelle Motive innerhalb des LTag umfassen das Kernlokalisierungssignal (NLS) (Cuesta et al., 2010).

Das große T-Antigen besitzt ein onkogenes Potential, was die Bezeichnung als Tumorantigen erklärt (Fields et al., 2013).

1.2.3.6. Kleines Tumor-Antigen (*Small Tumour Antigen- sTAg, ,t'*)

Das kleine t-Antigen (sTAg) befindet sich im Nukleus und Zytoplasma. Es wird aus 172 Aminosäuren gebildet und teilt sich seinen ORF und die gleiche N-terminale Startstelle beim Nukleotid 5013 mit dem großen T-Antigen (LTag). Allerdings sind die zwei T-Antigene unterschiedlich gespleißt, was dazu führt, dass sie unterschiedliche 3'-Enden haben. Das Abbruchsignal befindet sich für das sTAg am Nukleotid 4495 und für das LTag am Nukleotid 2603 (Ferenczy et al., 2012). Es ist ein Zystein-reiches Protein mit einer Länge von 124 bis 194 Aminosäuren (Fields et al., 2013). Die einzigartige Domäne der kleinen T-Antigene der

Säugetier-Polyomaviren enthält hochkonservierte Regionen von Zystein- und Histidin-Aminosäuren (Chen et al., 2007; Uhn et al., 2007), die besonders wichtig für die Bindung an das zelluläre Protein Phosphatase 2A (PP2A) sind (Assetta and Atwood, 2017; Pallas et al., 1990).

1.2.3.7. Die alternativ gespleißten T-Antigen-Varianten

JCV produziert eine Reihe von alternativ gespleißten mRNAs, die sich in ihren Spleißmustern insbesondere für das große T-Antigen unterscheiden und zusätzliche Proteine kodieren, die als T'135, T'136 und T'165 bezeichnet werden (Ferenczy et al., 2012).

Das große T-Antigen sowie das kleine T-Antigen und die alternativ gespleißten T-Varianten (Ferenczy et al., 2012) treiben die ruhende Wirtszelle durch Bindung an pRB (RB1), an RB-verwandten Proteine wie das p107 (RBL1) und p130 (RBL2) in die S-Phase. Dadurch tragen sie zum Verlust ihrer Repressionsfunktionen bei (Fields et al., 2013).

1.2.4. NCCR Region und Varianten

1.2.4.1. NCCR-Funktion, Varianten und Pathogenität

Die Wirtszellen müssen während der JCV-Infektion diverse Proteine exprimieren, die die virale regulatorische Region (NCCR: ‚*Non Coding Control Region*‘) erkennen, um die RNA-Transkription und DNA-Replikation zu initiieren. Diese genetische Region beinhaltet mehrere Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen und weist meistens eine von zwei Haupt-Sequenzanordnungen auf, den sogenannten Archetyp und den Mad-1-Typ (Major et al., 2018).

Der NCCR-**Archetyp** besteht aus etwa 200 linearen Nukleotiden, wird bis 56% der gesunden Bevölkerung in Virionen im Urin ausgeschieden und wird im Allgemeinen als nicht-pathogener NCCR-Typ betrachtet (Cook, 2016; Major et al., 2018). Im Gegensatz dazu kann der pathogene **Prototyp** (auch als JCV **Mad-1** bekannt) in Gehirnen von Patienten mit PML, wie bei dem Indexpatient mit den Initialen ‚J.C.‘, auftreten. Bei dieser Variante sind die etwa 200 Nukleotide des Archetyps nicht linear angeordnet, sondern häufig in der Form von 98 Basenpaaren Tandem-Wiederholungen zu finden (Ferenczy et al., 2012; Major et al., 2018).

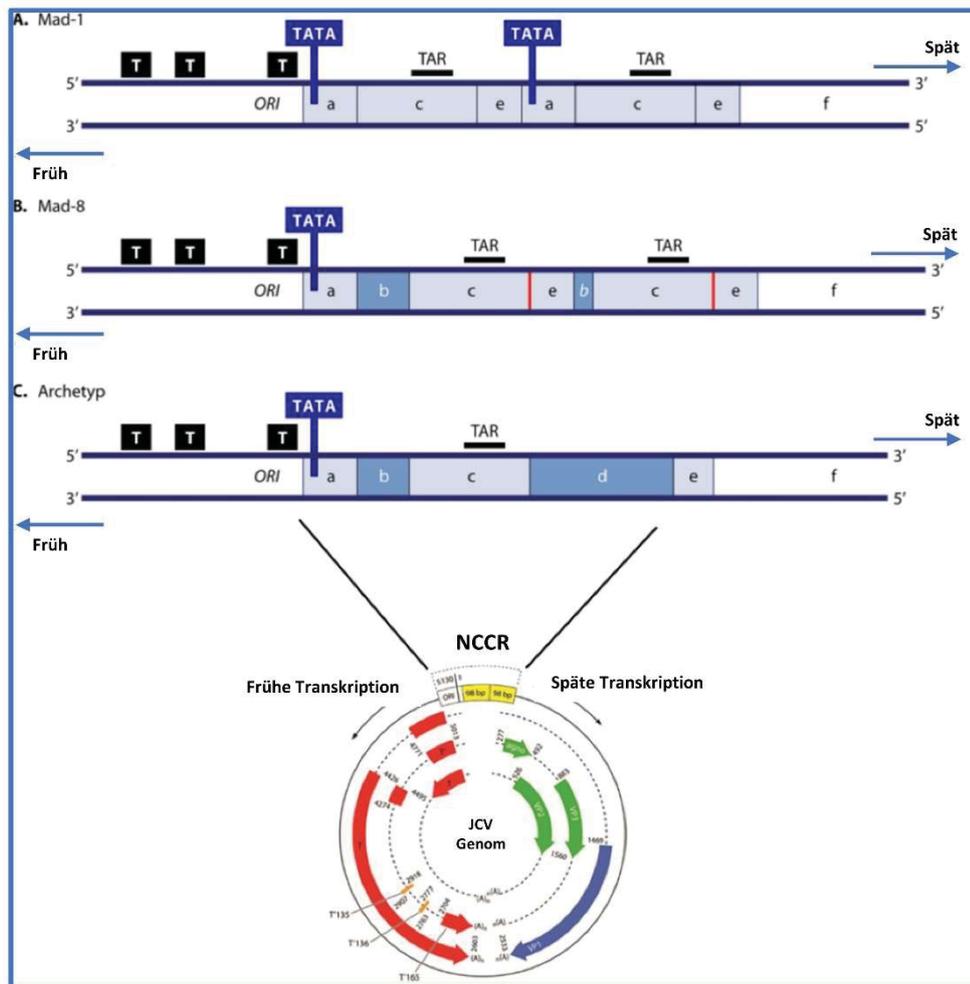


Abb. 6: Unten: Graphische Darstellung des JCV-Genoms mit Lokalisation der NCCR (gelb) zwischen den frühen und späten Bereichen der Transkription. Oben: Schema der DNA-Sequenz-Blöcke der NCCR von dem JCV-Archetyp, dem MAD-1 und dem MAD-8. Der Ursprung der Replikation wird als ‚ORI‘ bezeichnet und die Kleinbuchstaben a, b, c, d, e und f kennzeichnen Sequenzblöcke. Adaptiert und modifiziert von (Assetta and Atwood, 2017; Ferenczy et al., 2012).

1.2.4.2. Bedeutung der Wiederholungen, der Neuarrangements (‚Rearrangements‘) und TATA-Boxen

Die NCCR des ursprünglichen JCV-Isolats ‚Mad-1-Typ‘ enthält ein sogenanntes ‚Enhancer-Element‘, das als eine 98-bp Tandem-Wiederholung vorliegt. Solche Wiederholungen beinhalten weiterhin sich wiederholende TATA-Boxen, die sowohl weitere mRNA-Startstellen (Ferenczy et al., 2012; Ghosh et al., 1981; Gluzman et al., 1980), als auch mehrere Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen sein können (Frisque, 1983).

Die Tandemwiederholungsstruktur der **Mad-1**-Variante besteht aus drei Sequenzblöcken: „a“, „c“ und „e“. Allerdings wird die TATA-Box nur in „a“ gefunden (s. Abb. 6). Laut viele Studien und wie auch weiter oben beschrieben, erscheinen die TATA-Box(en), die in der ‚a-

c-e'-98-bp-direkten Wiederholungsstruktur enthalten sind, essentiell für die Transkription von frühen und späten viralen Genen zu sein (Ferenczy et al., 2012).

Die natürlich vorkommende Variante der NCCR ist der ‚**Archetyp**‘ (bzw. CY'-Typ) und besteht nur aus einer Kopie der 98-bp-Sequenz von a-c-e, die von den 23-bp ("b") und 66-bp ("d") Sequenzblöcke zwischen " a ", " c " und " e " unterbrochen wird und dadurch wird ein a-b-c-d-e-Motiv aufgebaut (s. Abb. 6). Der Archetyp ist nur selten mit der Entwicklung einer PML assoziiert (Ferenczy et al., 2012; Yogo et al., 1990). Der direkte Vergleich der zwei Typen (Mad-1 vs. Archetyp) ließ die Identifizierung von sechs wichtigen Sequenz-Blöcken ‚a‘ bis ‚f‘ zu und bestätigte den Archetyp als die vollständige Ursprungssequenz (s. Abb. 6) (Ferenczy et al., 2012).

Im Laufe der Zeit wurden unterschiedliche NCCR-Varianten aus Geweben von PML-Patienten isoliert, die eine besondere Tandem-Wiederholungs-ähnliche Struktur enthalten (Martin et al., 1985). Der Mad-1-Typ war die erste isolierte JCV-NCCR-Variante von Patienten mit PML (Ferenczy et al., 2012; Lynch and Frisque, 1990; Martin et al., 1985). Die Isolierung von Tandem-Wiederholungs-ähnlichen bzw. -identischen NCCR-Sequenzen in Proben von PML-Patienten, stärkt die Theorie über die Wichtigkeit dieser Struktur in der PML-Pathogenese (Ferenczy et al., 2012).

Bei vielen PML-Patienten ist ein vorherrschender NCCR-Genotyp zusammen mit anderen Minoritäten zu finden. Diese Variationen beinhalten Wiederholungen, Insertionen und Deletionen im Vergleich zu dem Prototyp und Archetyp. Das Isolat **Mad-8** ist häufiger als Mad-1 nachzuweisen. Dieser NCCR-Typ enthält eine Wiederholungsstruktur zusammen mit einer großen Deletion, einer großen Insertion und weitere kleineren Insertionen und Nukleotid-Substitutionen (s. Abb. 6) (Ferenczy et al., 2012).

Die Entstehung der NCCR-Varianten ist bislang nur teilweise verstanden. Theoretisch könnte die Prototypvariante Mad-1 durch Deletion und Duplikation von der Archetyp-Sequenz abgeleitet werden, allerdings wurde so etwas bisher nicht bestätigt (Ferenczy et al., 2012). Eine Koinfektion mit Epstein-Barr-Virus als benötigter Antrieb beim Übergang des Archetyps zur Prototypvariante ist auch in der Literatur vorgeschlagen worden (Wortman et al., 2016). Ebenfalls unbekannt ist der Zelltyp, in dem eine solche Neuordnung der NCCR auftreten könnte, wobei die Lymphozyten eine mögliche Wirtszelle darstellen (Major et al., 2018). Über den möglichen Zelltyp, der die benötigte

Persistenz und den bestimmten ‚Rearrangement‘-Mechanismus verfügt, wird weiter unten berichtet (s. Kapitel 1.3.2).

1.2.5. Biologie des Virus

1.2.5.1. Anbindung an der Zelloberfläche

Bei den bisher untersuchten Polyomaviren wurde die Bindung an Wirtszellen als eine Interaktion zwischen dem Viruskapsid und den negativ geladenen Sialinsäure-haltigen Wirtsrezeptoren demonstriert. Die Grundlage der frühen Bindung und des Eintritts in der Zelle wurden bei den verwandten und Struktur-ähnlichen SV40 und murinen Polyomaviren (mPyV) ausführlich analysiert und zunächst als Model-Wechselwirkungen zu unserem Verständnis der JCV-Pathogenität angepasst (Ferenczy et al., 2012), denn es existierte für lange Zeit keine Kristallstruktur des JCV-VP1-Pentamers. Das monosialylierte Gangliosid GM1 dient als Hauptrezeptor für SV40, während die an den Rezeptoren GD1a und GT1b vorhandenen α 2,3- und α 2,6-verknüpften Sialinsäuren für die Anbindung von mPyV nötig sind (Smith et al., 2003; Tsai et al., 2003). Das JCV dagegen bindet an das LSTc (Lactoseries Tetrasaccharid C), ein lineares sialyliertes Oligosaccharid, das sich von den verzweigten Formen anderer Polyomavirusrezeptoren unterscheidet (Fields et al., 2013). JCV verwendet als LSTc-Rezeptor sowohl die α 2,3- als auch α 2,6-verknüpfte-Sialinsäuren (Dugan et al., 2008). Parallel wurde bereits ein funktionelles Rezeptormotiv für ein rekombinantes JCV-VP1-Pentamer beschrieben, das sich spezifisch an LSTc bindet, und zwar nicht nur über die terminale α 2,6-verknüpfte Sialinsäure, sondern auch über den benachbarten GlcNAc-Zucker (Neu et al., 2010a). Zusätzlich nutzt das JCV auch den Serotonin-Rezeptor 5HT_{2A}R als Korezeptor (Elphick et al., 2004). Dieser Rezeptor wird in Gliazellen und damit in den Zielzellen des Virus exprimiert. Die Antikörper gegen den 5HT_{2A}-Rezeptor, als auch die 5HT_{2A}-Rezeptor-Antagonisten werden als therapeutisches Vorgehen vorgeschlagen, während die Expression des 5HT_{2A}-Rezeptors in sonst nicht infizierbaren Zellen sie suszeptibel für Infektionen macht (Fields et al., 2013).

Bei Patienten mit PML sind verschiedene Substitutionen mehrerer VP1-Aminosäurestellen mit veränderter Bindungsspezifität assoziiert und werden mit reduzierter Bindungsaffinität zur Sialinsäure in Verbindung gebracht (Sunyaev et al., 2009). Die meisten PML-assoziierten Mutationen machen das Virus unfähig, an LSTc oder an anderen sialylierten Glykanen zu

binden (Gorelik et al., 2011; Maginnis et al., 2013). Dennoch haben sich einige PML-assoziierte JCV-Mutanten als fähig erwiesen, an Asialo-GM1, einem nicht-sialylierten Glykan, zu binden (Geoghegan et al., 2017; Gorelik et al., 2011). Es gibt direkte Hinweise darauf, dass Wildtyp- und PML-mutierte JCV-Stämme verschiedene Eintrittsmechanismen nutzen: Das Wildtyp-JCV kann an zwei Hauptrezeptoren binden, hauptsächlich an den bekannten sialylierten Glykanen (LSTc), und in geringerem Umfang an nicht-sialylierten Glykosaminoglykane (GAGs). Im Gegensatz dazu wird die Bindung der JCV-Mutanten primär durch GAGs vermittelt (Geoghegan et al., 2017). Die Hemmung der Infektiosität der JCV-Mutanten VLPs (*Virus-like Particles*) durch die Nutzung von Heparin, einem GAG-Molekül, stärkt zusätzlich das Konzept, dass die SA-Mutanten die GAG-Moleküle anstelle von den physiologischen JCV-Wildtyp-Rezeptoren nämlich den α 2,6-verknüpften sialylierten Glykanen (LSTc), für ihren infektiösen Eintrag benötigen (Geoghegan et al., 2017).

1.2.5.2. Eintritt und intrazelluläre Transport (Trafficking)

Die Polyomaviren dringen in die Wirtszellen ein und laufen durch verschiedene intrazelluläre Kompartimente, während sie gleichzeitig zahlreichen sequentiellen Konformationsänderungen unterliegen, die zur Entkapsidierung und zum Transport in den Zellkern führen. Es gibt eine Vielfalt an endozytischen Eintrittsmöglichkeiten unter den Mitgliedern der Polyomavirusfamilie. Einige davon sind der typische Clathrin-vermittelte Weg, die Variante über Caveolae und die Makropinozytose (Marsh and Helenius, 2006; Tsai and Qian, 2010). Im Gegensatz zu SV40, mPyV und BKV, die die oben genannten Eintrittsmechanismen verwenden, dringt JCV durch Clathrin-beschichtete Vesikel in die Zellen ein und wird weiterhin zu den Rab5-markierten, frühen Endosomen transportiert (Tsai and Qian, 2010). Nach diesem Transit von Rab5-Endosomen wird eine Umleitung zu pH-neutralen, Caveolin-1-markierten Vesikeln (Caveosomen) beobachtet und nicht die erwartende Reifung zu Rab7-markierten Endosomen (Assetta and Atwood, 2017). Der Grund für diese Änderung in der Reifung ist noch unklar. 12 bis 16 Stunden nach der Infektion ist das JCV für eine produktive Infektion an der Peripherie des endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert (Ferenczy et al., 2012).

Beim Erreichen des ER-Lumens dringen die Polyomaviren in die ER-Membran ein und

interagieren mit Komponenten der Wirtsproteinfaltung und der ER-Qualitätskontrolle für eine produktive Infektion (Assetta and Atwood, 2017) :

Es wird angenommen, dass die Translokation durch die ER-Membran entweder direkt durch mechanische Perforation der Membran mit Hilfe der exponierten VP-2- und VP-3-Domänen oder durch Protein-leitende Kanäle und Mitglieder der ‚Derlin‘-Proteinfamilie als Komponenten von dem ER-assoziierten Abbau-Weg (ERAD) durchgeführt wird (Vembar and Brodsky, 2008). Nach der Retro-Translokation wird angenommen, dass die veränderten Kalziumkonzentrationen im Zytosol oder eine Implikation des Proteasom-Abbaus infolge des ERAD-Signalweges eine Virus-Konformation erzeugen kann, die den Kernzugang durch das Destabilisieren des Viruskapsids und das Herausstellen des Kernlokalisierungssignals (NLS) fördert (Ferenczy et al., 2012; Tsai and Qian, 2010).

Nach dem Eintritt in den Zellkern werden die Polyomavirus-Genome in der Nähe von PML-NBs abgelagert. Die PML-NBs (Promyelocytic leukemia - Nuclear Bodies), auch als Kerndomänen 10 (ND10) bekannt, sind dynamische, punktförmige Strukturen mit vielfältigen Funktionen, darunter die Transkriptionsregulation und das Chromatin-Remodeling‘ (Assetta and Atwood, 2017).

1.2.5.3. Die Replikation und die Transkription

Nach dem Eintritt in den Nukleus werden die Polyomavirus-Genome in spezifischen Loci abgelagert. Dies sind die PML-NBs, die dynamische Nuklear-Unterstrukturen mit einer Vielfalt von Funktionen sind. Dort findet die DNA-Replikation, das Chromatin-‚Remodelling‘, die Transkriptionsregulation und der Zusammenbau des Kapsids statt (Shishido-Hara et al., 2004). Sie sind eine Art von DNA-Gerüst (*scaffold*) für die Rekrutierung vom großen T-Antigen (LTag) im Zusammenhang mit Transkription aktivierenden Proteinen und DNA-Replikationsproteinen. Darüber hinaus ist das JCV-Genom nach einer Infektion an den ND10-Körpern genauso nachzuweisen (Shishido-Hara, 2010).

Im Zellkern können zwei miteinander verbundene Prozesse beobachtet werden, die DNA-Replikation und die Gentranskription. In beiden Prozessen spielt das LTag eine zentrale Rolle und wird für die JCV-Replikation benötigt. Mit einem mutierten nicht funktionellen T-Antigen kann keine lytische Infektion ausgelöst werden (Ferenczy et al., 2012). Darüber hinaus kodieren die Polyomavirus-Genome keine viruseigenen Komponenten für die

Replikation, sondern die Zellreplikationsmaschinerie muss dafür genutzt werden (Assetta and Atwood, 2017). Um eine DNA-Replikations-freundliche Umgebung zu fördern, bindet sich das LTA_g an zelluläre Proteine und an die zelluläre DNA, um Signale zu induzieren, die die ruhende Zellen in Richtung S-Phase treiben (Caracciolo et al., 2006; Dickmanns et al., 1994; Ferenczy et al., 2012; Khalili et al., 2008).

Zur Initiierung der DNA-Replikation bildet das LTA_g ein Doppelhexamer und dient als Helikase, das einen Komplex mit Topoisomerase I, DNA-Polymerase α und Replikationsprotein A bildet (Ferenczy et al., 2012). Konkret setzen sich die 2 LTA_g-Hexamere in einer sog. „Kopf-Kopf-Struktur“ zusammen. Die festgebundenen LTA_g-Hexamere ‚gehen‘ in entgegengesetzte Richtungen zum Abwickeln der viralen DNA und damit wird der Zugang der DNA-Replikationsmaschinerie der Zelle ermöglicht (Assetta and Atwood, 2017).

Die JCV-Replikation ist bezüglich der Kinetik ein sehr langsamer Prozess. Selbst in empfindlichen Zellen, in denen das T-Antigen bereits vorhanden und funktionell ist, findet tagelang keine DNA-Replikation statt (Major et al., 1985). Die DNA-Replikation ist 3 bis 5 Tage nach der Infektion in suszeptiblen Zelltypen nachzuweisen und die Dauer beträgt mehrere Wochen (Feigenbaum et al., 1987; Khalili et al., 1987).

Die Wechselwirkung von sT-Ag mit PP2A blockiert die Dephosphorylierung des späten Agnoproteins, was eine vermehrte virale Replikation ermöglicht (Ferenczy et al., 2012; Sariyer et al., 2008). Eine Störung bei der Verfügung der Spleißstellen der drei alternativen Spleißvarianten T'135, T'136, T'165 des T-Antigens mit den gemeinsamen N-Termini mit dem großem T-Antigen führt im Gegenteil zu einer Reduzierung der Virusreplikation (Ferenczy et al., 2012; Trowbridge and Frisque, 1995).

Im Gegensatz zu anderen humanen DNA-Viren, wie z. B. Herpes-Viren, bringt JCV keine transkriptionsaktivierenden Proteine in die neu infizierte Zelle. Die frühe Transkription erfolgt also ebenso wie die Virusreplikation direkt durch Faktoren der Wirtszelle. Wie weiter oben beschrieben enthält die NCCR Bindungsstellen einer Reihe von fördernden aber auch hemmenden Transkriptionsfaktoren (Ferenczy et al., 2012).

Die Verfügbarkeit des Wirts-Transkriptionsfaktors ist sowohl für den Start der frühen Transkription als auch für die Menge des produzierten T-Antigens entscheidend. Obwohl die NCCR-Isolate mit Wiederholungen (wie das MAD-1 oder MAD-4) sowie die Varianten,

die aus PML-Stämmen isoliert wurden, eine höhere Transkriptionsaktivität in PDA-Zellen aufweisen, bleibt die Transkriptionsaktivität sowohl des Archetyps als auch der PML-Isolate viel höher in Gliazellen als in Zellen mit unterschiedlichem Ursprung (Ault, 1997; Ferenczy et al., 2012; Sock et al., 1996).

Das LTA_g ist auch für den weiteren viralen Lebenszyklus entscheidend, daher müssen die Wirtszellen spezifische Transkriptionsfaktoren exprimieren, die zusammen mit der Wirt-RNA-Polymerase II an den NCCR binden können (Assetta and Atwood, 2017).

Zahlreiche Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren und Repressoren sind in der Literatur vorgeschlagen worden. Diese werden sowohl mit der frühen als auch mit der späten Transkription und Replikation in Zusammenhang gebracht. Der Sp1-Transkriptionsfaktor ist der einzige Faktor, der vorwiegend bei der frühen Gentranskription wirkt (Assetta and Atwood, 2017; Henson, 1994), während das Oct-6 bei der Aktivierung der späten Transkription und vorwiegend bei den Gliazellen in Synergie mit dem LTA_g zu wirken scheint (Renner et al., 1994). Die Bindungssequenzen für Oct-6/SCIP liegen angrenzend zur TATA-Box der NCCR (Assetta and Atwood, 2017).

Es wurde gezeigt, dass Mitglieder der NFI-Familie (*nuclear factor I-Familie*) von Transkriptionsfaktoren die virale Gentranskription und die DNA-Replikation in Abhängigkeit von dem LTA_g entweder aktivieren (NFI-X) oder hemmen (NF-IA) können (Messam et al., 2003; Ravichandran and Major, 2008). Zusätzlich dienen die Mitglieder der AP-1-Familie von Proteinen (c-jun und c-fos) auch als Repressoren der Genexpression und der DNA-Replikation. Sowohl die NFI- als auch AP1-Familienmitglieder interagieren mit dem LTA_g. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass die NFI-Faktoren zur Erhöhung der frühen und späten Genexpression auf eine LTA_g-abhängige Weise beitragen (Ferenczy et al., 2012).

Andere Beispiele, die die Transkription beeinflussen, sind PUR α und YB-1, wobei das erste eine stimulierende Wirkung bei der frühen Gentranskription zeigt und das zweite die späte Gentranskription begünstigt (Chen et al., 1995). Weitere Faktoren sind das aktivierende NFAT4, NF- κ B und HIF-1 α und das inhibierende C/EBP β (Assetta and Atwood, 2017; Manley et al., 2006; Pina-Oviedo et al., 2009; Romagnoli et al., 2009; Safak et al., 1999).

1.2.6. Typen und Subtypen des JCV

1.2.6.1. Die Klassifikationssysteme

Die ausführliche Charakterisierung des JCV über viele Jahre ergab, dass es nur einen Haupt-VP1-Serotyp gibt, aber mindestens 7 Genotypen (Hirsch et al., 2013).

Vor dem System der Eingruppierung der JCV-Varianten anhand ihrer NCCR-Architektur wurden mehrere virale Typisierungssysteme entwickelt (Ferenczy et al., 2012). Vor der Klassifizierung der JCV – DNAs anhand der archetypischen NCCR (Yogo et al., 1990) wurden die PML-JCV-Isolate entsprechend ihrer Reihenfolge der ‚Rearrangements‘ (Modifikationen) im NCCR in zwei Typen, Typ I und II eingeteilt (Walker DL, 1986; Yogo et al., 2004). Yogo und Kollegen (Yogo et al., 1991) schlugen ein neues System für die JCV-Klassifizierung vor, das auf den verschiedenen Nukleotid-Unterschieden im viralen Genom basierte (Yogo et al., 2004). Die frühen Systeme verwendeten die Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus-Typisierung (‚RFLP‘). Dadurch war es möglich die JCV-Genotypen in die Klassen A, B und C zu kategorisieren (Ikegaya et al., 2005; Yogo et al., 2004). Allerdings wurden mit der zunehmenden Verwendung der DNA-Sequenzierung neue Genotypen anhand der genetischen Sequenz definiert. Zunächst wurde eine Region von 610 bp verwendet, die das 3‘ Ende des T-Antigens, die intergene Region und das 3‘ Ende von VP1 abdeckte (Agostini et al., 1995; Ault and Stoner, 1992; Ferenczy et al., 2012; Iida et al., 1993). Später wurde ein Typisierungssystem anhand der DNA-Sequenzierung entwickelt. Bei diesem System wurden die DNA-Sequenz-Polymorphismen von mehreren JCV-DNA-Sequenzen zusammen mit den vorhergesagten AS-Sequenzen aller Kodierungsregionen zur Typisierung verwendet (Cubitt et al., 2001; Ferenczy et al., 2012).

Bei der Verwendung dieses Systems wurden 7 JCV-Typen mit den Nummern 1 bis 8 identifiziert, der Typ 5 wurde als Mitglied des Typs 3 eingeteilt (H. T. Agostini et al., 1997; Ferenczy et al., 2012). Es wurden darüber hinaus mehreren Subtypen gefunden (Ferenczy et al., 2012).

1.2.6.2. Die aktuellen JCV-Genotypen

Bei dem bereits genannten System, das auf den DNA-Sequenz-Polymorphismen von 100 JCV-Sequenzen in voller Länge basierte, wurden 8 Hauptgenotypen identifiziert (Cubitt et al., 2001) (s. Tabelle 2).

Für die Genotyp-Klassifizierung sind die folgenden geographischen Anmerkungen wichtig (s. Abb. 7):

- 1. Es wird angenommen, dass der Typ 6 der ursprüngliche JCV-Typ ist, der sich zusammen mit den menschlichen Populationen weiterentwickelt hat. Die Typen 3 und 6 wurden überwiegend aus afrikanischen und afrikanisch-amerikanischen Populationen isoliert (Ferenczy et al., 2012).
- 2. Die VP1-Kodierungssequenzen der asiatischen und südasiatischen Typen 2D1, 7C1 und 7C2 sind identisch und werden als VP1-Konsensus-Sequenzen bezeichnet. Deren Unterscheidung und Subtypisierung erfordert daher die anschließende Sequenzierung von VP2-, VP3-, Agnoprotein- und LTA_g- Genregionen (Hirsch et al., 2013).
- 3. Die europäischen und die europäisch-amerikanischen JCV-Genotypen 1A und 1B stammen von der VP1-Konsensussequenz ab und weisen die Aminosäuren-Substitutionen an den Aminosäurestellen 75R, 117S, 158L, 245K bzw. 74S, 117S, 126A auf, während der europäische und europäisch-amerikanische Genotyp 4 mit den Substitutionen 134A und 164T ein etwas geringeres PML-Risiko beinhaltet (Agostini et al., 2001; Hirsch et al., 2013).
- 4. Der asiatische und eurasische Genotyp 2B weist die Aminosäure-Substitution 126A auf, die mit höherem PML-Risiko assoziiert wird, (Agostini et al., 2000) während der Typ 2A zu den asiatischen und nativen amerikanischen Populationen gehört (Ferenczy et al., 2012).

Es ist interessant, dass der Genotyp 2B eine starke Assoziation mit dem Auftreten einer PML zeigt und so entweder eine virale Determinante der Virulenz beinhaltet oder dass dieser Genotyp sich der Immunabwehr besser entziehen kann. Jedoch ist es auch möglich, dass die statistische Assoziation eine mehr oder weniger intensive medizinisch-therapeutische oder diagnostische Aufarbeitung der betroffenen ethnischen Gruppen in der entwickelten Welt widerspiegelt (Hirsch et al., 2013).

Typ	VP1-AS-Änderung vs. Konsensus-Sequenz	Ethnische Gruppe(n)	Identische VP1 Sequenzen	Erforderliche Kodierungssequenzen zur vollständigen Typisierung
1A	75R, 117S, 158L, 345K	Europäisch/Europäisch-Amerikanisch		
1B	74S, 117S, 126A	Europäisch/Europäisch-Amerikanisch		
2A1	113(L), 117(A), 126(A), 164(T)	Asiatisch/Native Amerikanisch		
2A2	115L	Asiatisch/Native Amerikanisch		
2B	126A	Asian/Eurasian	2D2	
2D1	Konsensus	Asiatisch, Südasiatisch	7C1, 7C2	VP2/VP3, VP2, T
2D2	126A	Asiatisch, Südasiatisch	2B	VP2/VP3, Agnoprotein, T
2E	113L, 321I	Westpazifik-Populationen	7A	VP2, Agnoprotein, T
3A	134A, 164T, 321I, 332Q	Afrikanisch/Afrikanisch-Amerikanisch	3B	t, T
3B	134A, 164T, 321I, 332Q	Afrikanisch/Afrikanisch-Amerikanisch	3A	t, T
4	134A, 164T	Europäisch/Europäisch-Amerikanisch		
6	164T	Afrikanisch		
7A	113L, 321I	Asiatisch	2E	VP2, Agnoprotein, T
7B1	113(L)	Asiatisch		
7B2	37V, 321I	Asiatisch		
7C1	Konsensus	Asiatisch, Südasiatisch	2D1, 7C2	VP2/VP3, VP2, Agnoprotein, T
7C2	Konsensus	Asiatisch, Südasiatisch	2D1, 7C1	VP2/VP3, VP2, T
8A	12H, 164T	Papua-Neuguinea	8B	VP2/ VP3, VP2, Agnoprotein, T
8B	12H, 164T	Westpazifik-Populationen	8A	VP2/ VP3, VP2, Agnoprotein, T
(PML) VP1-Mutante	55F (Gehirn) *, 60 M/E/N *, 66H *, 265D/T **, 267F/L **, 269F/Y/C (Gehirn) **			

Tabelle 2: Die VP1-Genotypen und die damit assoziierten ethnischen Gruppen. Adaptiert und modifiziert nach (Ferenczy et al., 2012). Identische VP1-Sequenzen sind mit gleicher Farbe markiert. AS-Änderung: Aminosäure-Änderung. Die in Klammern () gesetzten Aminosäure-Änderungen deuten eine Inzidenz von weniger als 50% innerhalb des Typs hin. Fettdruck zeigt die wichtigste Aminosäure für den Subtyp an dieser Stelle an. **2B:** Typ mit etwas höherem PML-Risiko, **4:** Typ mit etwas geringerem PML-Risiko.

* BC-Schleife (LSTc-Bindungstasche), ** HI-Schleife (LSTc-Bindungstasche).

1.2.6.3. Die Genotypisierung des JCV und die humane Migration

Die verschiedenen ethnischen Gruppen auf der ganzen Welt sind mit bestimmten JCV-Subtypen in Zusammenhang gebracht worden. Die Ähnlichkeit zwischen diesen Subtypen erlaubte die Vorhersage über den JCV-Vorfahren und konnte zusammen mit der Entstehung der menschlichen Spezies (*Homo sapiens*) in Afrika, dem prähistorischen Migrationsmuster auf der ganzen Welt und der nachfolgenden ethnischen Vielfalt korreliert werden (s. Abb. 7) (Agostini et al., 2001; Hirsch et al., 2013; Stoner et al., 2000; Sugimoto et al., 2002, 1997).

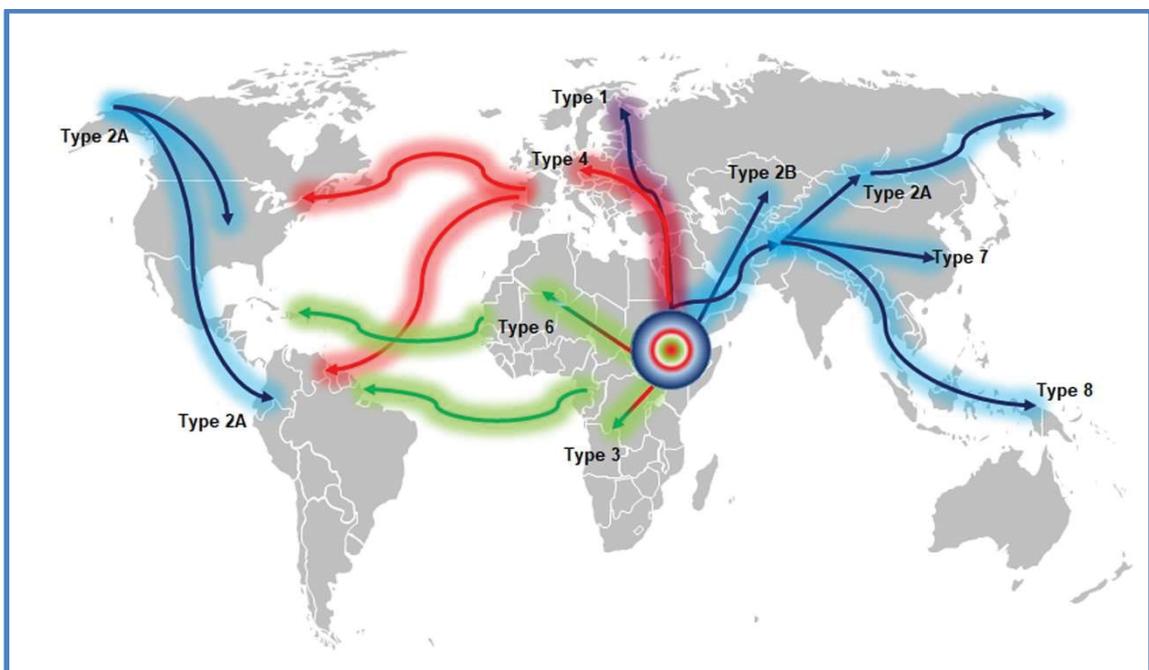


Abb. 7: Die menschliche Migration in prähistorischen Zeiten und die JC Polyomavirus-Typenverteilung in der Welt – [Adaptiert und modifiziert nach (Hirsch et al., 2013; Stoner et al., 2000)].

Konkret wurde dazu die genetische Variation des Y-Chromosoms ausgiebig untersucht, um die Migrationen und die Populationsstrukturen von menschlichen Gruppen in Zusammenhang zu bringen (Jobling and Tyler-Smith, 2003; Yogo et al., 2004). In diesen Studien wurden Haplotypen als auch Haplogruppen verwendet, um die genetische Variation im Y-Chromosom darzustellen. Zunächst wurde diese theoretische Korrelation von wirts-chromosomalen und viralen Markern bei den anthropologischen Befunden als kritisch gesehen (Yogo et al., 2004). Dennoch wurde eine signifikante Übereinstimmung in den geographischen Verteilungsmustern zwischen den Y-Chromosom-Haplogruppen (Y-

Haplogruppen) und den JCV-Genotypen festgestellt. (Hammer, 2002). Laut dieser Studie bietet die JCV-Genotypisierung ein neues Werkzeug in der anthropologischen Untersuchung der menschlichen Populationen (Hammer, 2002; Yogo et al., 2004).

1.2.6.4. Die PML assoziierten JCV-VP1-Varianten

In den letzten Jahrzehnten wurden die DNA-Veränderungen in den kodierenden Regionen des JCV-Genoms von Hirnbiopsien und Liquor-Proben der PML Patienten erforscht. Darin erwiesen sich die Mutationen in den strukturellen VP1-Aminosäuresequenzen als sehr entscheidend für die Entwicklung der PML oder seltener anderer neurologischer Erkrankungen, wie die JCV-Meningitis und die JCV-Körnerzellneuronopathie des Kleinhirns (*Granule Cell Neuroopathy, GCN*). Die Mutationen bestimmter Aminosäurestellen im Bereich der Sialinsäure-Bindungsstelle und Oberflächenschleifen von VP1 sind nach heutigem Stand stark mit der PML assoziiert (Ferenczy et al., 2012; Gorelik et al., 2011; Sunyaev et al., 2009).

Die häufigsten PML-assoziierten VP1- Mutationen		
AS-Position	Wild-Typ	VP1-Mutante
55 (54)*	L	F
60 (59)	K	M, E, N
265 (264)	N	D, T
267 (266)	S	F, L
269 (268)*	S	F, Y, C

Tabelle 3: Darstellung der häufigsten VP1-Mutationen mit Aminosäuren (AS)-Substitutionen aus PML-Patienten. Die rot-markierten Mutationen L55F und S269F vertreten ca. 50% der PML-assoziierten Mutationen: Modifiziert nach Sunyaev et al., 2009 (Sunyaev et al., 2009) Die Nummern in Klammern stellen eine alternative Nummerierung der AS-Stellen im VP1 in der Literatur dar, die von verschiedenen wissenschaftlichen Kreisen benutzt wird. Dabei wird das Methionin (M) -die erste AS des Proteins- nicht gezählt.

Tatsächlich weisen die Virusisolate von PML-Patienten 80-90% Mutationen an einer oder mehreren diesen AS-Stellen des VP1 auf (Maginnis et al., 2013). Sehr interessant ist, dass

die Aminosäure-Substitutionen in den VP1-Schleifen häufig nur in JCV-Isolaten aus Hirngewebe, Liquor und Blut von PML-Patienten nachgewiesen werden. Sie treten nicht in Urin-Proben von Patienten mit PML auf (Gorelik et al., 2011; Maginnis et al., 2013). Die Liquor- und Urin-Sequenzen wiesen ansonsten bei den einzelnen Patienten identische Genotypen und Polymorphismen als auch dieselben Virus-Subtypen auf (Maginnis et al., 2013). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die VP1-Mutationen mit der Entwicklung von PML verbunden sind (Maginnis et al., 2013; Zheng et al., 2005) und sie erst Jahre nach der Erstinfektion mit dem JCV-Archetyp bei Immunsuppression erscheinen (Ferency et al., 2012).

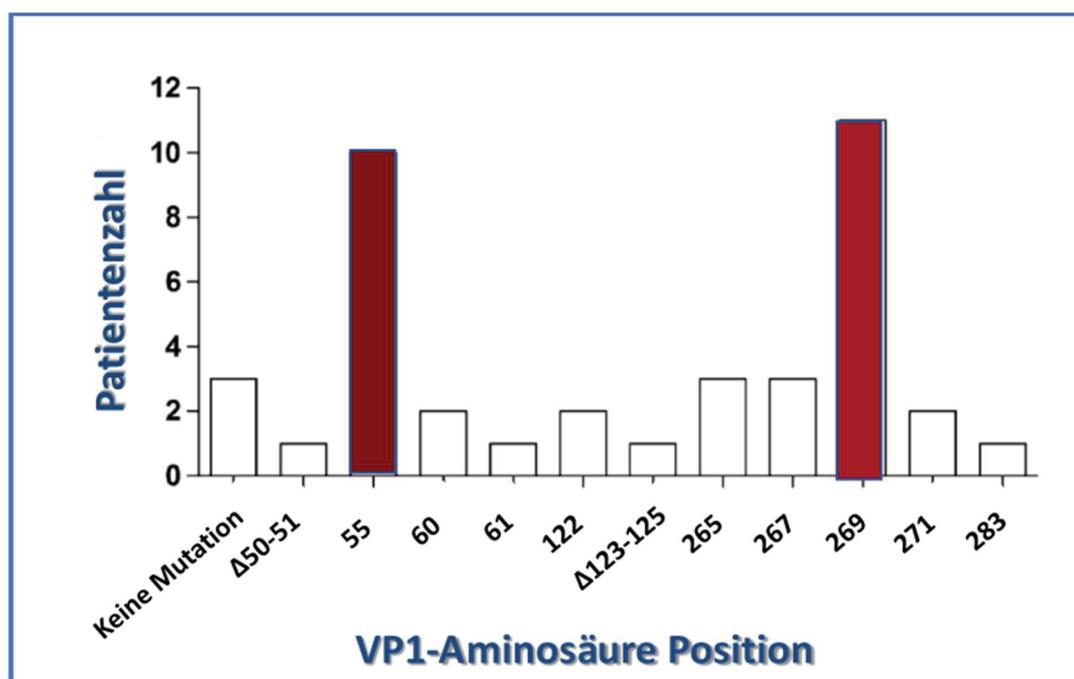


Abb. 8: Die Inzidenz von VP1-PML-assoziierten Mutationen aus dem Liquor von PML-Patienten. Mit Rot sind die häufigsten Mutationen markiert. Die Anzahl der PML-Patienten, die bestimmte VP1-Mutationen oder Deletionen im Liquor beherbergen, wird in der X-Achse angezeigt. Die Mutationen der Sequenzen im Liquor wurden in der dazugehörigen Studie (Gorelik et al., 2011) mit den entsprechenden VP1-Sequenzen aus Urinproben (sofern verfügbar) oder mit 253 Sequenzen (GenBank) von Nicht-PML-Personen verglichen. (Modifiziert und adaptiert von Gorelik et al, 2011).

Vermutlich sind die verschiedenen Mutationen der Aminosäuren auf der Oberfläche des VP1 ein Hinweis von beschleunigter, adaptiver Evolution der VP1- Sequenz und damit eine Auswahl der am besten angepassten VP1-Varianten aus Proben von PML-Patienten, aber nicht gesunden Individuen (Sunyaev et al., 2009).

Die häufigsten PML-assoziierten Mutationen sind L54F und S268F, die etwa 50% der PML-assoziierten Mutationen ausmachen (s. Tabelle 3, Abb. 8). Die Mutationen S266F und S268Y sind etwas seltener nachzuweisen (Maginnis et al., 2013; Reid et al., 2011). In diesem Zusammenhang wird auf eine Diskrepanz bei verschiedenen Nummerierungen der AS-Stellen von VP1 in der Literatur hingewiesen, die von unterschiedlichen wissenschaftlichen Kreisen benutzt und publiziert wird. Dabei wird die Nummerierung ab dem Translation-Initiierungs-Kodon, der ersten AS (Aminosäure) des VP1 [Methionin (M)] in Frage gestellt. In der hier vorliegenden Dissertation wird das Methionin als die erste Translations-AS von VP1 gezählt und somit die Nummerierung von Gorelik et al., 2011 übernommen.

Die Rolle einiger PML-assoziierten Mutationen wurde mit Hilfe virusähnlicher Partikel (VLPs) auf dem Hintergrund des JCV-Genotyps 3 analysiert und ihre Fähigkeit, an Sialinsäurezellrezeptoren zu binden, wurde mittels eines ELISA-Tests (*Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay*) gemessen (Gorelik et al., 2011; Maginnis et al., 2013).

Das Wildtyp-JCV und die Wildtyp-VLPs, weisen eine besondere Eigenschaft auf: sie hämagglutinieren in sehr niedrigen Konzentrationen Erythrozyten. Die mutierten Viren und VLPs mit den Mutationen 55F, 267F, 269F oder 269Y weisen jedoch diese Eigenschaft nicht mehr auf. Die Wirkung von Mutationen auf die Hämagglutinationsfähigkeit deutet darauf hin, dass diese die zelluläre Bindung an den Rezeptor aufheben und so den Zelltropismus von JCV *in vivo* verändern können (Gorelik et al., 2011).

Es wurde bereits beschrieben (s. Kapitel 1.2.5.2.), dass das JCV genauso wie viele andere Polyomavirus-Spezies die sialylierten Glykane (LSTc) für seinen Eintritt in den Zellen benötigt (Geoghegan et al., 2017; Maginnis et al., 2013; Ströh and Stehle, 2014). Ebenso wurde bei Wildtyp-VLPs die stärkste Bindung zu den sialylierten -GD1b, -GD2 und -GT1a Gangliosiden gezeigt (Maginnis et al., 2013). Im Gegensatz dazu haben die aus dem Gehirn von PML-Patienten gewonnenen JCV-Mutantenstämme diese Eigenschaft verloren. Die obengenannten Mutationen verhindern die Bindung an sialylierte Glykanen, die als Rezeptoren für den infektiösen Eingang von Wildtyp-JCV dienen (Geoghegan et al., 2017). Die Einführung dieser Mutationen in den VLPs führt allerdings zu einer veränderten Rezeptornutzung, die mit einer erhöhten Affinität zu den nicht-sialylierten Glykosaminoglykanen (GAGs) Gangliosiden einschließlich GM1, GM2 und GD3 einhergeht (Geoghegan et al., 2017; Gorelik et al., 2011; Maginnis et al., 2013).

Es ist interessant, dass das Wildtyp-JCV die asialo-GM1 und GD1a als alternative Zell-Rezeptoren verwenden kann, aber die Bindung an diese Rezeptoren schwächer ist, während die Bindung an weitere asialo-Ganglioside nur unerheblich beeinflusst ist (Geoghegan et al., 2017; Maginnis et al., 2013). Im Gegensatz dazu verlieren dieselben mutierten VLPs und JCV-Mutanten, die über keine Hämagglutinationseigenschaft mehr verfügen (d. h. die Mutanten 55F, 60E, 265D, 267F, 269F und 269Y s. Abb. 9), auch die Fähigkeit für die Bindung an alle sialylierten Ganglioside (Gorelik et al., 2011). Dadurch zeigen sie einen veränderten Zelltropismus mit reduzierter Bindung an Nierenzellen, Erythrozyten und lymphatische Zellen. Sie behalten jedoch ihre Fähigkeit, sich an den Gliazellen SVG-A-Zellen und Astrozyten zu binden (Gorelik et al., 2011). Geoghegan und Kollegen zeigten dazu, dass die *in vitro* Substitution der Zellen mit nicht-sialylierten Gangliosiden (GAGs) die Infektiosität der PML-Mutanten erhöhen kann (Geoghegan et al., 2017).

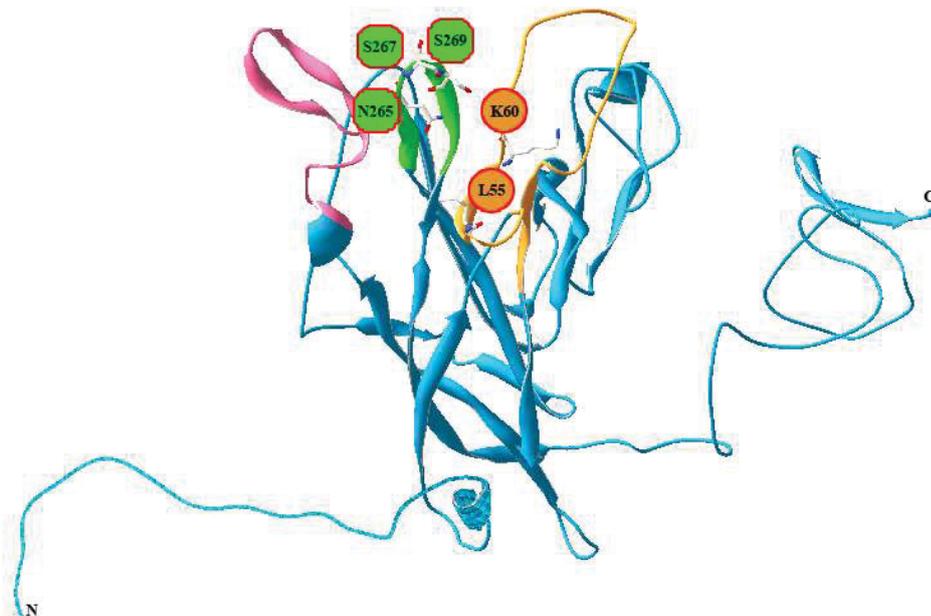


Abb. 9: VP1 Monomer Abbildung basierend auf der Struktur des kristallisierten SV40-VP1 (PDB-Kennzeichen:1SVA (Stehle et al., 1996)), modelliert mittels HH-Pred-Software und selbstgezeichnet mit Swiss PDB viewer (<https://spdbv.vital-it.ch/>) (s. Kapitel 2.1.7 und 2.2.8). Mit lila, grün und orange werden die DE, HI und BC Schleifen (*loops*) entsprechend dargestellt. Die jeweiligen PML- AS-Stellen (L55F, K60E/M/N, N265D/T, S267F/L, S269F/Y/C) sind in der LSTc-Bindungstasche lokalisiert und werden entsprechend dort dargestellt.

Die verloren gegangenen Eigenschaften der Mutanten-JCV-Stämme, nämlich die Hämagglutination und die Bindung an sialylierten-Glykan-Rezeptoren, sind von besonderem Interesse aufgrund der Lokalisierung der beteiligten Mutationen. Obwohl diese AS-Stellen in einer linearen Struktur ziemlich weit voneinander entfernt sind, sind die

am häufigsten mutierten AS-Positionen 55 und 269 als auch alle erwähnten Mutationen auf der 3-dimensionalen Proteinstruktur zusammen lokalisiert (Neu et al., 2010a) und betreffen AS-Positionen am VP1, die Kontakte mit der terminalen Sialinsäure des spezifischen sialylierten Rezeptormotivs LSTc bilden (Maginnis et al., 2013). Diese VP1-Mutationen oder -Deletionen, die ein Teil der LSTc-Bindungstasche sind, verursachen einen Verlust oder eine dramatische Veränderung der Sialinsäure-Spezifität des Virus (Gorelik et al., 2011; Maginnis et al., 2013).

Eine Hypothese ist, dass der Verlust der Sialinsäurebindung sowie die Aufhebung der Hämagglutinationseigenschaft und der Bindung an periphere Zellen durch die oben beschriebenen Mutationen eine vermehrte Ausbreitung im Gehirn und eine nachfolgende Sialinsäure-unabhängige Infektion der Gliazellen begünstigen könnte (Maginnis et al., 2013). Theoretisch erlaubt die reduzierte Bindung an LSTc-Rezeptoren in der Peripherie eine erhöhte Verbreitung von JCV im Gehirn, da die JCV-Zell-Bindung sowohl an Erythrozyten als auch an B-Lymphozyten über Wechselwirkungen mit Sialinsäure vermittelt und dadurch für die JCV-PML Mutante erschwert wird (Maginnis et al., 2013).

1.3. PML: Die Pathogenese

1.3.1. JCV Infektion, die Theorie und die Pathogenese-Stadien einer PML

Auch wenn einige Schritte nicht vollständig aufgeklärt wurden, haben Major und Kollegen folgende Stadien der PML-Pathogenese bei Patienten unter Natalizumab Behandlung (s. auch Kapitel 1.6.1) vorgeschlagen (Major et al., 2018): in Analogie zu den murinen Polyomavirus- und SV40- Infektionen könnte die Übertragung durch Aerosol-Inhalation oder orale Aufnahme des Virus stattfinden. Anschließend findet meistens eine subakute Infektion und die Stimulierung von antiviralen Antikörpern statt, gefolgt von einer Infektion der Nieren beziehungsweise des Uroepithels, was zu einer asymptomatischen persistierenden Infektion mit Replikation oder latenten Infektion mit bzw. ohne intermittierende Ausscheidung von JCV DNA über die Harnwege führt. Laut der vorherrschenden Hypothese könnte das Virus dann über den Blutkreislauf z.B. ins Lymphgewebe und Knochenmark gelangen. An diesen Orten könnte dann das Virus zu Zeiten einer Immunsuppression aktiviert werden. Dabei könnte die Infektion von hematopoetischen Vorläuferzellen, z.B. den CD34+ -Zellen im Knochenmark eine Rolle

spielen, die in erhöhter Zahl unter Natalizumab-Therapie mobilisiert im peripheren Blut nachweisbar sind. Diese Zellen haben eine Replikationsapparat, der auf dem Weg zur Differenzierung zu B-Zell-Vorläufer und weiter zu B-Lymphozyten die ideale Wirtsumgebung für virale Mutationen und die Virusvermehrung bieten könnte (Johnson et al., 2013). Die Nukleotid-Umordnungen („*Rearrangements*“) der NCCR könnte hypothetisch in diesem Stadium auftreten und zwar in den B-Zell-Vorläufern, die als Kandidaten für die Rekombination und den Transport von JCV-Sequenzen vermutet werden (Houff et al., 1988; Houff and Berger, 2008; Johnson et al., 2013). Sie besitzen einen speziellen DNA-Rekombinations-Apparat. Da insbesondere der V(D)J-Rekombinations-Apparat so gestaltet ist, dass er ständig gezielt neue Antikörpergene erzeugen kann, umfasst er mehrere Proteine, welche die Infrastruktur für Rekombinationen im Allgemeinen bilden könnte und die Replikation von JCV befördern könnte (Johnson et al., 2013). Zwar wird die JCV- Vermehrung in Pre-B-Zellen möglicherweise von CD4+ - und CD8+ -T-Zellen unter Beteiligung von Anti-JCV-Antikörpern erkannt, viele infizierte Zellen entkommen aber dieser JCV-gerichteten Immunabwehr und JCV könnte so in zirkulierenden B-Zellen oder als nicht-zellassoziertes freies Virion hämatogen ins Gehirn gelangen (Chapagain and Nerurkar, 2010; Johnson et al., 2013). Viele DNA-Transkriptionsfaktoren der NCCR Region und miRNAs werden durch Natalizumab beeinflusst, was die Virusvermehrung in infizierten B-Zellen begünstigen könnte (Major et al., 2018).

1.3.2. Theorien über die Zielorte der Persistenz im Wirt

Die Infektionen in menschlichen Endothelzellen, in der Niere und in Zellen der hämatopoetischen Linie stellen klinisch keine bekannten pathologischen Auswirkungen dar und machen die Infektion zu einem stillen Ereignis, das sogenannte Persistenz- bzw. Latenz-Stadium des Virus. Im Gehirn hingegen geht die Vermehrung in Oligodendrozyten mit einer Lyse der Zellen einher und verursacht die PML mit einem ausgeprägtem klinischen Bild, das weiter unten beschrieben wird (Major et al., 2018).

Die latente Existenz des Virus ohne Zerstörung der Wirtszelle führt zur einem Ausbleiben der Immunabwehr und anschließender Beseitigung des Virus aus der Wirtszelle (Imperiale and Jiang, 2016). Um den Immunabwehr weitgehend zu entgehen, minimiert das Virus seine Synthese von Proteinen, die als fremde Antigene die Immunabwehr befördern

könnten. Es herrscht somit möglicherweise eine Balance zwischen geringer viraler Genexpression und Immunkontrolle, bei der die virale Genomreplikation Schritt mit Zellwachstum und Zellteilung halten soll (Imperiale and Jiang, 2016).

1.3.2.1. Theorien über die Zielorte der Persistenz im Wirt

Bisher sind unterschiedliche Theorien bezüglich der Stellen von Latenz des JCV beschrieben worden. Diese beziehen sich auf die jeweiligen direkte Virus-Nachweise, die als Material meistens Urin, Nierenbiopsien, Liquor, Hirnbiopsien, Blut, Lymphknoten und Knochenmark umfassen.

1.3.2.2. Harnsystem und Geschlechtsapparat

Mit Verwendung von Methoden für den direkten Virusnachweis wie dem Southern-Blot oder der RT-PCR wurde das JCV in verschiedenen Gewebetypen wie Niere, Harnleiter, Blase, Prostata, Zervix, Vulva und Sperma identifiziert. Allerdings war die allgemeine Inzidenz des JCV-Nachweises in denselben Materialien viel niedriger im Vergleich zum BKV-Nachweis. Insbesondere in den Nierenbiopsien wurde das BKV in 10 von 30 Proben und das JCV nur in 3 von 30 Proben nachgewiesen (Doerries, 2006; Heritage et al., 1981; Imperiale and Jiang, 2016). Besonders bei den immunkompetenten Individuen ist eine asymptomatische JCV-Reaktivierung im Harnsystem eher selten nämlich bei 13% der gesunden Individuen, aber häufiger als eine asymptomatische BKV-Reaktivierung die bei 6% von gesunden Individuen vorkommt (Boukoum et al., 2016) und führt zur Exfoliation der Epithelzellen und anschließenden Ausscheidung des Virus im Urin (Imperiale and Jiang, 2016).

1.3.2.3. Gehirn

Mittels Laser-Capture-Mikrodissektion und anschließender PCR wurde die JCV-DNA in den Oligodendrozyten und in geringerem Umfang in den Astrozyten im Frontalen Cortex eines nicht-PML-Individuums nachgewiesen (Bayliss et al., 2012; Perez-Liz et al., 2008). Somit könnte das Gehirn eine bevorzugte Stelle für die JCV-Persistenz darstellen könnten.

1.3.2.4. Das hämatopoetische System

Zunächst wurde vorgeschlagen, dass das hämatopoetische System als Reservoir für das Latenz-Stadium des Virus dient und dass es auch die Verbreitung der Infektion beeinflusst. Mittels *in situ*-Hybridisierung oder PCR wurde das JCV in peripheren Blutzellen (Ciappi et al., 1999) nachgewiesen, einschließlich der CD34+ hämatopoetischen Vorläuferzellen, mononukleären Zellen, Granulozyten, B- und T-Lymphozyten, sowie in lymphatischen Geweben einschließlich der Lymphknoten, der Milz und der Mandeln (Imperiale and Jiang, 2016; Monaco et al., 1998, 1996; Tan et al., 2010). In diesem Zusammenhang wurde als Nebenwirkung von Natalizumab die Hypothese diskutiert (s. weiterunten Kapitel 1.6.1.), dass es durch die Mobilisierung von mononukleären Zellen aus dem Knochenmark eine PML auslösen könnte (Wollebo et al., 2015).

a. B Lymphozyten, CD34+ -Zellen, Knochenmark

Bei PML-Fällen kann das JCV-Genom im Hirngewebe und in B-Zellen aus Blut, Knochenmark oder Lymphknoten nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass die ‚NCCR-Rearrangements‘ im Knochenmark bereits existieren, erhöht allerdings die Wahrscheinlichkeit, dass das Knochenmark einfach ein intermediäres Gewebe ist und keine primäre Stelle der Infektion darstellt. Die vorherrschende Hypothese ist, dass die B-Lymphozyten das JCV ins Gehirn bringen (Johnson et al., 2013). Es ist allerdings noch unklar, ob die CD34+ -Zellen oder irgendeine Untergruppe von B-Zellen ein primäres Transportmittel von JCV darstellen können. In Hirnbiopsien und im Liquor von PML Patienten sind Tausende bis zu Millionen Kopien viraler DNA nachzuweisen. Hingegen infizieren sich die B-Lymphozyten nicht massiv mit JCV. Interessanteweise weisen sie eine Infektion mit etwa nur einem Viruspartikel pro 20 Zellen auf (Dörries et al., 1994). Diese Tatsache stärkt die Theorie, dass das JCV eine kleinere Untergruppe von B-Lymphozyten als erstes infiziert (Johnson et al., 2013). Trotz dieser geringgradigen Infektion der B-Lymphozyten stellen die B-Vorläufer-Zellen die besten Kandidaten sowohl für den Transport als auch die Rekombination von JCV-Sequenzen dar, denn sie verfügen über den bereits beschriebenen V(D)J-Rekombinations-Apparat (s. Kapitel 1.3.1.). Es ist vorstellbar, dass mehrere Zelltypen als Zwischenstationen in verschiedenen Stadien der JCV-Progression zur Neurovirulenz wirken (Johnson et al., 2013).

b. NCCR ‚Rearrangements‘ und miRNA

Die NCCR kontrolliert sowohl die frühe als auch die späte Transkription des Virus. Eine genetische Umordnung-‚Rearrangement‘ wird häufig auf der späten proximalen Seite der NCCR (White et al., 2009) beobachtet, die angeblich Enhancer-Elemente enthält und somit den Promoter beeinflusst. Eine direkte Konsequenz der NCCR-Umordnung könnte sich in einer Veränderung der Expression von viralen microRNAs (miRNAs) widerspiegeln, die die Expression früher mRNAs regulieren. Dadurch produziert das mutierte Virus weniger miRNA als der Archetyp-Stamm zugunsten der Replikation (Broekema and Imperiale, 2013; Imperiale and Jiang, 2016, 2015). Im Gegensatz dazu könnte es sein, dass weniger „frühe“ mRNA infolge einer erhöhten miRNA-Expression beim JCV-Archetyp die Etablierung der Persistenz erleichtert und folglich das Virus fähig ist, der Immunantwort des Wirts zu entkommen (Imperiale and Jiang, 2016, 2015).

1.3.2.5. Endothelzellen und Gastrointestinaltrakt

Als weitere Latenzorte werden die Endothelzellen der Gefäße sowie die Epithelzellen des Gastrointestinaltrakts vorgeschlagen. Von den Endothelzellen kann sich das Virus in die peripheren Gewebe und Organe ausbreiten. (Imperiale and Jiang, 2016). Der direkte Nachweis des Virus in Epithelzellen des Gastrointestinaltrakts und auch in Stuhlproben von gesunden Individuen deutet auf eine Persistenz in der Ebene des Gastrointestinaltrakts hin (Imperiale and Jiang, 2016; Vanchiere et al., 2009).

1.4. Epidemiologie des JCV und Immunantwort

1.4.1. Humorale Immunantwort

Die JCV-Infektion löst normalerweise eine humorale Immunantwort und Antikörperproduktion aus. In mehreren seroepidemiologischen Studien ist eindeutig gezeigt, dass das JCV weltweit verbreitet ist und mehr als 50% der Erwachsenen spezifische

JCV-IgG Antikörper aufweisen. Dabei findet man ca. 15% Seropositivität im zweiten Jahrzehnt und bis zu 80% im siebten und achten Jahrzehnt des Lebens (Major et al., 2018). Entsprechend sind auch ca. 55% der MS-Patienten JCV-seropositiv (Major et al., 2018; Outteryck et al., 2014).

Die JCV-Antikörper binden an unterschiedliche Schleifen-Epitope des hypervariablen Kapsidproteins VP1 und blockieren *in vitro* die Zellanheftung des Virus und seinen Eintritt in die Zelle (Jelcic et al., 2015). Dennoch schützen die Antikörper den Wirt nicht gegen eine PML-Erkrankung, d.h. die Annahme, dass eine JCV-Infektion durch Antikörper komplett kontrolliert wird, ist nicht wahrscheinlich (Major et al., 2018). Dagegen spricht unter anderem, dass gesunde Individuen, die das JCV persistierend im Urin ausscheiden, stets seropositiv sind, aber nicht in der Lage sind, die Ausscheidung oder eine Virämie zu verhindern. Gleichfalls weisen die PML-Patienten mit hohen Viruslasten im Liquor auch hohe Konzentrationen von Antikörpern im Liquor auf, die allerdings keinen Einfluss auf die Entwicklung und Kontrolle der PML zu haben scheinen (J. R. Berger et al., 2017; Major et al., 2018; Warnke et al., 2014). Offensichtlich scheinen die verfügbaren Antikörper keinen Schutz zu bieten, eine Tatsache, die unter anderem darauf zurückzuführen sein könnte, dass die VP1-Mutanten oder die verschiedenen Serotypen der Antikörperneutralisierung im Sinn eines Immunescapes entgehen könnten (Imperiale and Jiang, 2016).

Im Gegensatz zu den PML-VP1-Mutanten sind die Wildtyp-JCV-Viren und die VLPs bekannt für ihre Eigenschaft, die humanen Erythrozyten zu hämagglutinieren (Gorelik et al., 2011; Maginnis et al., 2013; Sunyaev et al., 2009). Ohne eindeutige strukturelle Daten zu haben, deuten alle bisherigen Ergebnisse darauf hin, dass die JCV-neutralisierenden IgG-Antikörper in der Lage sind, die LSTc-Bindungstasche auf der Oberfläche des Wildtyp-VP1-Pentamers besetzen zu können. An dieser definierten Stelle findet auch die Bindung des Wildtyp-Virus an den sialylierten Glykanen der Zelloberfläche wie dem LSTc statt (Neu et al., 2010a).

Allerdings geht die Existenz von VP1-Mutationen immer mit einer geringen Affinität des Virus zu seinen üblichen Zellrezeptoren, nämlich den sialylierten Glykanen (LSTc) einher, wie weiter oben bereits erwähnt (s. Kapitel: 1.2.6.4.). Obwohl die PML-VP1-Mutanten mit den LSTc nicht optimal interagieren können, werden sie dennoch durch einige der getesteten Antikörper wirksam neutralisiert. Dadurch können die VP1-Mutanten eventuell weiterhin die apikale Tasche verwenden, um sich an nicht-sialylierte Glykan-Korezeptoren

(GAGs) anzuheften. Vermutliche Wechselwirkungen von Antikörpern mit der VP1-Bindungstasche erlauben die effektive Neutralisation der PML-Mutanten-Stämme (Geoghegan et al., 2017).

Die GAGs haben sich auch als alternative Bindungsrezeptoren für den infektiösen Eintritt sowohl von PML-JCV Mutanten als auch von Wildtyp-JCV erwiesen (Geoghegan et al., 2017).

Folglich scheint es, als ob diese apikale Glykan-Bindungstasche eine Art pharmakologisches Ziel für beiden Wildtyp- und PML-Mutanten-Stämme darstellen könnte, weil JCV-neutralisierende monoklonale Antikörper eine Infektion blockieren können, indem sie das Anheften am Ko-Rezeptor- in der apikalen Tasche verhindern. Dies könnte ein klinisches Potential zur Behandlung oder Vorbeugung von PML mit neutralisierenden Antikörpern bedeuten (Geoghegan et al., 2017).

1.4.2. Zellvermittelte Immunität gegen JCV

Die Zellantwort von CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten scheint eine wichtigere Rolle als die Antikörper bei der Immunantwort gegen JCV zu spielen. In diesem Zusammenhang sind die CD4⁺ T-Lymphozyten, die die wichtigsten JCV-Proteine (T-Antigen, VP1, VP2 und Agno) erkennen, entscheidend für die Kontrolle des JCV, während die CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen gegen das Prototyp-VP1 stets bei Patienten mit und ohne PML nachzuweisen waren (Gheuens et al., 2011; Major et al., 2018; Marzocchetti et al., 2009). Bei MS-Patienten unter Natalizumab-Therapie sinkt die CD4⁺/CD8⁺Ratio im Liquor (Imperiale and Jiang, 2016; Stuve et al., 2006) und eine geringe Anzahl von CD4⁺ -Zellen ist mit hohen Viruslasten bei den Patienten assoziiert (Imperiale and Jiang, 2016). Es gibt Hinweise, dass CD4⁺ T- Zellen, die zur Stimulation zytotoxischer CD8⁺ -Zellen und zur Beseitigung des Virus aus dem Gehirn notwendig sind, bei den PML-Patienten mit PML fehlen. Diese Beobachtung betont die Bedeutung von CD4⁺-, CD8⁺ -Zellen und anderen Immunsystemzellen mit Aktivität gegenüber den JCV-Antigenen (Major et al., 2018).

Die zytotoxische Immunreaktion kann jedoch zu gegenteiligen Effekten führen, da eine schnelle Wiederherstellung der virusspezifischen zytotoxischen Antwort zu einer Entzündung und einem sogenannten Immunrekonstitutionssyndrom (IRIS) beitragen kann (Imperiale and Jiang, 2016).

1.5. Progressive Multifokale Leukoenzephalopathie (PML)

Die PML ist eine demyelinisierende Erkrankung vorwiegend der weißen Substanz des menschlichen Gehirns, die durch eine lytische Infektion von Oligodendrozyten durch das Polyomavirus JCV verursacht wird. Obwohl die PML bei stark immunsupprimierten Personen und vor allem mit erhöhter Inzidenz bei HIV-1-Patienten auftritt, wird eine PML zunehmend bei Patienten diagnostiziert, die mit biologischen bzw. immunmodulatorischen Therapien wie monoklonalen Antikörpern, behandelt werden. Die immunmodulatorischen Therapien modulieren die Funktionen des Immunsystems sehr gezielt (Major, 2010).

1.5.1. Die Klinik

Der Goldstandard der PML ist weiter die Hirn-Biopsie mit der Darstellung der typischen histopathologische Trias sowie dem direkten Virusnachweis (s. Tabelle 4). Allerdings kann die Diagnose auch weniger invasiv gestellt werden unter Berücksichtigung der aktueller Diagnosekriterien. Diese erfordern den Nachweis: 1. JCV-DNA im Liquor mittels PCR; 2. Eine passende Klinik; 3. Eine PML-stimmige MRT; 4. Keine alternative Diagnose (Berger, 2011). Die vier häufigsten klinischen Erstmanifestationen sind die Hemiparese, Ganganomalien, retrochiasmale Sehstörungen und veränderter mentaler Status (Berger, 2011; Berger et al., 1987; Bohra et al., 2017).

Diese gehören auch zu den häufigsten Anzeichen im Verlauf der AIDS-bedingten PML. Eine kleinere Anzahl von Patienten zeigt eine Symptomatik, die sich auf die hintere Fossa bezieht, d. h. Ataxie, Dysmetrie und Dysarthrie, was normalerweise auf eine Beteiligung des Kleinhirns und des Hirnstamms hinweist (Berger, 2011; Bohra et al., 2017; Jones et al., 1982). Die PML kann sich auch mit einer untypischen Symptomatik manifestieren, die Anfälle, Schwindel, sensorische Defizite, Aphasie, Bewegungsstörung und Neglect-Syndrome einschließt (s. Tabelle 4) (Berger, 2011; Berger et al., 1987; Bohra et al., 2017; Brooks BR, 1984).

PML-Merkmale			
Klinische Merkmale	Radiologische Merkmale	Labormerkmale	Pathologische Merkmale (PML-Trias)
<ul style="list-style-type: none"> • Motorische u. • Sensorische Störungen • retrochiasmale Sehstörungen • Sprachstörung, Dysarthrie • Mentale Veränderungen • Kopfschmerzen • Schwäche • Anfälle • Parkinson • Aphasie • Andere Klinik je nach Läsionsstelle 	<ul style="list-style-type: none"> • Subkortikale Läsionen • CT-Scan: nicht-KM-aufnehmende subkortikale Hypodensitäten. • MRT-Scan mit verändertem Signal der subkortikalen Läsionen. 	<ul style="list-style-type: none"> • EEG: fokale Verlangsamung • Liquor: leichte Erhöhung des Proteins oder eine erhöhte Zellzahl. • Direkter Virus-Nachweis: Virus-Antigen u. -DNA, Viruspartikeln in lymphozytären Zellen 	<ul style="list-style-type: none"> • Intranukleäre basophile od. eosinophile Einschlüsse in den geschwollenen Kernen von Oligodendrozyten • Untypische, große, gelegentlich mehrkernige Astrozyten • Demyelinisierung

Tabelle 4: Klinische, radiologische, Labor- und pathologische Befunde bei der Diagnose und dem Verlauf von PML. Modifiziert nach (Berger, 2011; Berger et al., 2013; Bohra et al., 2017). Abkürzungen: CT, Computertomographie; EEG, Elektroenzephalogramm MRT, Magnetresonanztomographie; PML, progressive multifokale Leukoencephalopathie; KM, Kontrastmittel.

Die häufigsten zugrunde liegenden Erkrankungen sind die HIV-Infektion, die hämatologischen Malignome und die Behandlung mit monoklonalen Antikörpern (MABs *Monoclonal Antibodies*). Bei hämatologischen Malignomen liegt die PML-Inzidenz bei 0,07%. Die höchste Inzidenz der PML beträgt jeweils 1 Fall pro 1.000, 1 Fall pro 32.000 und 3,12 Fälle pro 100.000 bei Patienten, die mit Natalizumab, Rituximab bzw. Fingolimod behandelt wurden (s. Tabelle 6, Kapitel 1.7), (Berger et al., 2018; Bohra et al., 2017).

1.5.2. Die PML-assoziierten Erkrankungen medizinhistorisch gesehen

1.5.2.1. Die frühen Jahre der PML-Historie

Die PML wurde erstmals im Jahr 1958 bei 2 Patienten mit Leukämie und Morbus Hodgkin beschrieben. In einer weiteren Studie von 22 Patienten mit der gleichen Symptomatik wurde bereits die Vermutung geäußert, dass in der Pathogenese der PML ein viraler Erreger

eine Rolle spielen könnte. Die Annahme wurde bei dem Patienten J.C. bestätigt und der virale Erreger bekam eine Identität (Haley and Atwood, 2017) (s. auch Kapitel 1.2.1).

1.5.2.2. Die zweite Ära der PML-Historie: AIDS

Nach der Identifizierung des Virus blieb die PML über 2 Jahrzehnte eine seltene Erkrankung, bis sie als eine schwere Komplikation der HIV-1-Infektion in den frühen Tagen der AIDS-Pandemie als sekundäre Manifestation der Krankheit auftauchte (Haley and Atwood, 2017). Im Jahr 1984 wurden 230 Fälle von PML veröffentlicht, darunter betrafen die Patienten mit AIDS 2,1% der Fälle (Brooks BR, 1984). Als die HIV-Infektion epidemische Ausmaße annahm, stieg die Inzidenz von PML deutlich an (Holman et al., 1998). Ein repräsentativer Bericht von 156 PML-Fällen über die Jahre 1980 bis 1994 ergab eine noch höhere PML-Inzidenz unter den HIV1/AIDS-Patienten: 98,7% der PML-Patienten waren bereits mit HIV infiziert (Berger *et al.*, 1998a; Haley and Atwood, 2017). In einer weiteren landesweiten Stichprobe von ca. 9700 PML-Fällen zwischen den Jahren 1998-2005 vertraten die HIV1-infizierten Patienten 80% der Fälle, während der restliche Anteil mit hämatologischen Malignomen, soliden Tumoren, systemischem Lupus erythematodes, rheumatoider Arthritis und anderen Bindegewebserkrankungen assoziiert war (Haley and Atwood, 2017; Molloy and Calabrese, 2009). Die Einführung von HAART (hochaktive antiretrovirale Therapie) zur Behandlung von HIV-infizierten Patienten führte zu einem Rückgang der Inzidenz sowie der Mortalität der PML bei HIV1-infizierten Patienten (Antinori et al., 2003; Haley and Atwood, 2017).

1.5.2.3. Die dritte Ära der PML-Historie: Das Natalizumab und andere immunmodulatorische Therapien

Als die seltene demyelinisierende Krankheit PML im Jahr 2004 als Komplikation der Natalizumab-Behandlung bei Multipler Sklerose (MS), einer häufigeren immunvermittelten und nicht Erreger-bedingten demyelinisierenden Erkrankung des ZNS, auftrat, erschien dies zu Anfang rätselhaft und führte zu detaillierten Untersuchung der Pathogenese PML (Major, 2009).

1.6. Immunmodulatorische Therapien und das PML-Risiko

1.6.1. Natalizumab. Die Pathogenese der JCV-Reaktivierung unter Natalizumab-Behandlung

Natalizumab (Tysabri®) ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper und ein $\alpha 4\beta 1$ und $\alpha 4\beta 7$ Integrin-Antagonist, der an ein $\alpha 4$ -Integrinmolekül, nämlich das VLA-4 (*very late antigen - 4*) am $\beta 1$ - und $\beta 7$ -Epitop bindet (Major et al., 2018). Die Pathogenese der JCV-Reaktivierung unter Natalizumab-Behandlung ist multifaktoriell und auch nur teilweise verstanden:

- I. Mit seiner Bindung an VLA-4 zielt Natalizumab auf die Verhinderung des Übertritts von T- und B-Zellen über die Blut-Hirnschranke ab (Major, 2009). Somit reduziert es die entzündlichen Immunreaktionen, die für die Entstehung als auch für die Rückfälle der Multiplen Sklerose verantwortlich sind. Nachdem die ersten drei Fälle von PML identifiziert wurden, wurde Natalizumab 2005 zunächst vorübergehend vom Markt zurückgenommen (Major, 2009).
- II. Eine weitere Wirkung von Natalizumab ist, dass die Zahl von hämatopoetischen CD34+-Vorläufer-Zellen aus dem Knochenmark ebenso wie die von B-Zellen im peripheren Blut steigt. Da das JCV in diesen Zellen latent sein kann (s. oben), ist folgerichtig anzunehmen, dass die latent-infizierten CD34+-Zellen ins Blut gelangen und irgendwann zu einer B-Lymphozyten-Linie differenzieren können (Planas et al., 2012).
- III. Darüber hinaus fördert das Natalizumab die Hochregulierung einer Reihe von Genen, darunter auch Gene, deren Funktion die B-Zelldifferenzierung in der POU-Domänenfamilie ist (M. C. Monaco and Major, 2015). Eines dieser Gene erwies sich als das Gen für den Transkriptionsfaktor Spi-B, der an NCCR von JCV bindet. (Marshall et al., 2014, 2012, 2010).
- IV. Schließlich wurde noch gezeigt, dass Natalizumab die miRNA-126 reguliert, die einige dieser Gene zeitabhängig steuert (Meira et al., 2014). Die miRNA-126 kontrolliert und moduliert einige Immunzellfunktionen. Während der ersten 24 Monate der Behandlung wird die miRNA-126 von Natalizumab herunterreguliert, während sie nach 24 Monaten der Therapie hochreguliert wird. Der Faktor Spi-B ist ebenfalls von dieser Modulation betroffen und diese Tatsache könnte die niedrige

PML-Inzidenz bei den MS-Patienten unter Natalizumab-Behandlung während der ersten beiden Therapiejahre erklären. Nach dem zweiten Jahr der Behandlung steigt die Inzidenz der PML stark bis zu einem Risiko von ca. 1:80 (M. C. G. Monaco and Major, 2015).

Es wurden weitere monoklonale Antikörper (MABs) und andere neue Substanzen mit PML in Verbindung gebracht, welche je nach Indikation und unterschiedlichem Krankheitsmechanismus immunmodulatorisch funktionieren. Die wichtigsten und häufigsten PML-assoziierten medikamentöse Agenzien werden im Folgenden beschrieben (s. Abb. 10).

1.6.2. Weitere MABs und andere neue Substanzen mit PML-Risiko

Rituximab (HN- Handelsname: Rituxan®) ist ein chimärer MAB, der sich an den Zelloberflächenmarker CD20 bindet, um die peripheren zirkulierenden B-Zellen abzubauen (Casan et al., 2018). Das CD20 wird hauptsächlich von B-Lymphozyten exprimiert.

Das Medikament wurde zunächst von der FDA für die Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL), chronischer lymphatischer Leukämie (CLL), rheumatoider Arthritis mit Methotrexat als Kombinationstherapie, Granulomatose mit Polyangiitis und mikroskopischer Polyangiitis zugelassen. Dessen Beteiligung an der JCV-Reaktivierung infolge einer Behandlung und sich anschließender Entwicklung einer PML ist allerdings immer noch nicht im Detail geklärt, geht aber in jedem Fall mit einer B-Zellen-Depletion einher (Houff et al., 1988). Die Rituximab-assoziierten PML-Meldungen an die FDA und die Europäischen ‚EudraVigilance‘-Daten betragen bisher 2.163 Fälle, darunter 996 tödliche Fälle (Erskine, 2019).

Alemtuzumab- (HN: MabCampath®, Lemtrada®) ist ein weiterer humanisierter MAB, der an den CD52-Rezeptor von B, T,-Zellen und Monozyten bindet (Lundin et al., 1998). Das Medikament MabCampath® war für die Behandlung der chronischen lymphatischen B-Zell-Leukämie (CLL) zugelassen, die nicht auf eine Fludarabin-Therapie angesprochen hat (Demko et al., 2008; EU, 2008). Allerdings wurde er im Jahr 2012 aufgrund von 6 beschriebenen Fällen mit idiopathischer thrombozytopenischer Purpura (ITP) - darunter ein Todesfall - von dem europäischen und amerikanischen Markt genommen, aber im Jahr

2013 in Europa und im Jahr 2014 von FDA zur Behandlung der schubförmigen remittierenden MS wieder zugelassen und unter dem Namen Lemtrada® eingeführt (EU, 2012; McKee, 2012). Bei einem Patienten, der therapeutisch von Natalizumab auf Alemtuzumab umgestellt wurde, wurde ein tödlicher Einzelfall einer PML berichtet. Der Beginn der PML wurde auf die Natalizumab-Behandlung zurückgeführt (T. Berger et al., 2017).

Efalizumab – (HN: Raptiva®) bindet an die α -Untereinheit ($\alpha\text{L}\beta\text{2}$) des Leukozytenfunktions-Antigens-1 (CD11a), was zu einer Verhinderung der Lymphozyten-Aktivierung und Migration führt (Bohra et al., 2017; Schwab et al., 2012). Es ist aktuell von der FDA genehmigt und wird gegen schwere Plaque-Psoriasis und als Antirejektionstherapie bei bestimmten Transplantaten angewendet.

Am 19. Februar 2009 empfahl die Europäische Arzneimittelagentur das Ruhen der Zulassung nach der Meldung von 4 Efalizumab-assoziierten PML-Fällen (PML) (Bohra et al., 2017; Chappelle, 2009; EU, 2009).

Brentuximab vedotin (BV) – (HN: Adcetris®) ist ein Anti-CD30 MAB, er bindet an das CD30 Molekül und dient als eine bedeutende Therapiemöglichkeit bei Hodgkin-Lymphom und ALC. Er ist seit dem Jahr 2011 für die Behandlung von systemischen anaplastischen großzelligen Lymphomen (ALCL) und rezidivierenden klassischen Hodgkin-Lymphome im Stadium III oder IV in Kombination mit einer Chemotherapie zugelassen worden (EU, 2017a; Raisch et al., 2016). Von FDA werden bereits 3 Brentuximab-assoziierten PML-Fälle beschrieben (FDA, 2016).

Obinutuzumab (HN: Gazyvaro®, Gazyva®) wirkt gegen das CD20 Oberfläche-Antigen und wird aus diesem Grund bei B-Zell-Malignomen und therapieresistenter CLL gegeben (Bohra et al., 2017; EU, 2017b). Es wurde berichtet, dass PML bei Patienten auftritt, die mit Obinutuzumab bei rezidiviertem / refraktärem follikulärem Lymphom behandelt wurden (E. EU, 2014; Raisch et al., 2016).

Ein anderer Anti-CD20-MAK ist **Ofatumumab (HN: Arzerra®)**, ein humanisierter IgG1-Typ-Antikörper, der spezifisch an beide Schleifen des CD20-Antigens auf den B-Lymphozyten bindet und in Kombination mit Chlorambucil bei unbehandelter CLL und bei refraktärer CLL nach EU und FDA-Zulassung angewendet wird. Mehr als 14 PML-Fälle wurden bisher mit Ofatumumab assoziiert (Bohra et al., 2017; EU, 2014a; Raisch et al., 2016). Der Ausschuss für Humanarzneimittel vertrat die Auffassung, dass der Nutzen von Arzerra® für die Erhaltungstherapie bei CLL seine Risiken nicht überwiegt (EU, 2016a).

Ruxolitinib (HN: Jakavi®, Jakafi®) ist ein von der FDA genehmigter JAK- 1 und 2 Inhibitor. Derzeit wird er in Fällen von primärer *Polycythaemia Vera* (PV) und primärer Myelofibrose angewendet (Bohra et al., 2017; EU, 2015a; Raisch et al., 2016).

Fingolimod – (HN: Gilenya®) ist ein von der FDA genehmigter Immunmodulator (in der Natur als Myriocin aus dem Pilz *Isaria sinclairii* gewonnen), der antagonistisch zum Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor (S1PR) agiert (Baer et al., 2018) und zur Therapie bei hochaktiver, schubförmiger Multipler Sklerose angewendet wird. (Chun and Hartung, 2010; EU, 2017c). Bis April 2019 waren 21 Fingolimod-assoziierten PML-Fälle berichtet worden (Nakahara et al., 2019; Sinnecker et al., 2019).

Dimethylfumarat (DMF) – (HN: Tecfidera)® ist eine Substanz mit einer komplexen Wirkungsweise, die jedoch seit 2014 wirksam zur Behandlung von Psoriasis und schubförmig remittierender Multipler Sklerose (MS) angewendet wird. Das Medikament durchquert die Blut-Hirn-Schranke in der hydrolysierten Monomethyl-Form (MMF), die offenbar auch neuroprotektive Eigenschaften besitzt: Dadurch werden das „Nrf2“ -Protein und gewisse „antioxidative“ Gene, die am Schutz der Zellen vor Schäden beteiligt sind, aktiviert (EU, 2014b). Insbesondere führt DMF im Allgemeinen zur starken Abnahme von CD8+, und relativen Abnahme von CD4+ T-Zellen und CD19+ B-Zellen, während die Anzahl der naiven T-Zellen ansteigt. Zusätzlich scheint die Zahl der proinflammatorischen Th1- und Th17-T-Helferzellen abzunehmen, wodurch das Gleichgewicht in Richtung auf entzündungshemmende Th2-, T-regulatorische und B-regulatorische Untergruppen

verschoben wird (Mills et al., 2018). Bis März 2018 wurden 21 DMF-assozierte PML-Fälle berichtet (Yukitake, 2018).

Mycophenolatmofetil (MMF) – (HN: CellCept®) hemmt reversibel das Enzym Inosin-50-Monophosphat-Dehydrogenase, dessen Abwesenheit zur Hemmung der T- und B-Zellproliferation führt. Es ist für die Abstoßung von Allotransplantaten nach Nieren-, Herz- und Lebertransplantationen zugelassen (EU, 2015b). Zusätzlich ist es sehr potent bei der Behandlung einiger Autoimmunerkrankungen, darunter SLE und die autoimmune Glomerulonephritis. Darüber hinaus zeigt das Medikament eine umstrittene Wirkung bei einigen Fällen von Myasthenia Gravis. Im April 2008 veröffentlichte die FDA einen Sicherheitsbericht über einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Medikament und dem Auftreten von PML (Berger, 2010).

Weiterhin wurden einige **TNFa-Inhibitoren** (TNFa: Tumor Necrosis Factor alpha) mit der Entwicklung von PML assoziiert. Im Einzelnen sind dies die MABs: (a) Adalimumab mit 57 gemeldeten PML-Fällen darunter 2 publiziert, (b) Infliximab mit 116 gemeldeten PML-Fällen, darunter 10 publiziert und (c) Etanercept mit 87 gemeldeten PML-Fällen, darunter 1 publiziert (Erskine, 2019). Diese werden zurzeit für die Behandlung der Psoriasis, rheumatoiden Arthritis und anderen autoimmunen Erkrankungen angewendet werden (Ivan et al., 2017).

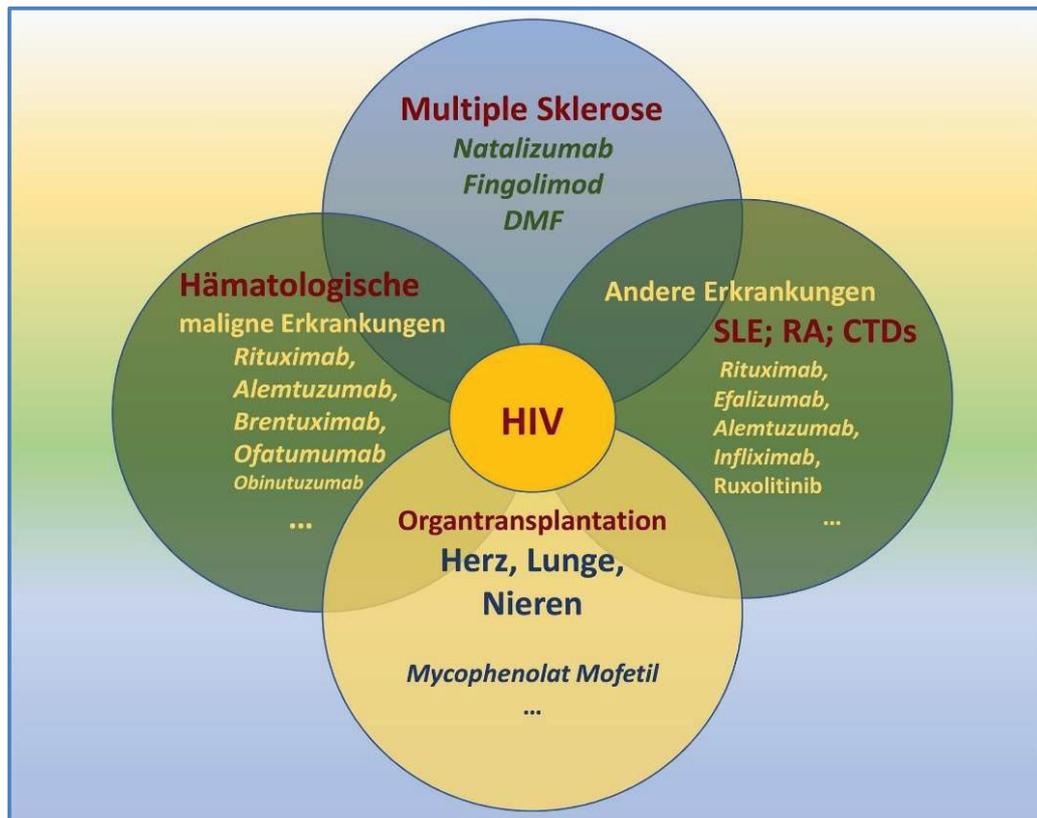


Abb. 10: Grunderkrankungen und PML-assoziierte Therapien. Adaptiert und modifiziert von (M. C. G. Monaco and Major, 2015).

Zaheer und Berger klassifizierten die Medikamente, die mit PML assoziiert sind, in die 3 folgenden Klassen (Raisch et al., 2016; Zaheer and Berger, 2012):

1. Medikamente wie Natalizumab und Efalizumab, die mit inhärentem PML-Risiko einhergehen, (Zaheer and Berger, 2012).
2. Rituximab, Mycophenolat mofetil und Brentuximab-Vedotin als Medikamente, die PML verursachen können, wenn sie bei Krankheiten mit erhöhtem PML-Risiko (hämatologische Malignome, Autoimmunerkrankungen) oder in Kombination mit anderen Immunsuppressiva verabreicht werden.
3. Medikamente mit noch ungeklärtem Risiko wie Alemtuzumab, Fludarabin, Fumarsäure und Infliximab sowie andere Inhibitoren des Tumor-Nekrose-Faktors- α , bei denen die Entwicklung von PML selten berichtet wurde (Zaheer and Berger, 2012).

1.6.3. PML-Erkrankungen bei Immunsystemkrankheiten, Immunmodulatorischen Medikamenten und HIV-Infektionen: Gemeinsamkeiten

II. Kategorie der Krankheit	Krankheiten, die mit PML assoziieren
Hereditäre Immundefizite	<ul style="list-style-type: none"> • Adenosin-Deaminase-Mangel • CD40-Liganden-Mangel • Kombinierte Immunschwäche • Allgemeine variable Immunschwäche • DOCK8-(<i>Dedicator of Cytokines 8 Protein</i>) -Mangel • Gamma Schwerekettenkrankheit • Hyper-IgM-Syndrom • Immunschwäche-Zentromerische Instabilität-Gesichtsdysmorphismus-Syndrom • Purin-Nucleosid-Phosphorylase-Mangel • Schwerer kombinierter Immundefekt (SCID) • Signal-Transducer und Aktivator der Transkription 1 Funktions-Immunschwäche • Wiskott-Aldrich-Syndrom • X-chromosomale verknüpfte Agammaglobulinämie • Idiopathische CD4 + Lymphopenie
Erworbene Immundefizite	<ul style="list-style-type: none"> • Humane Immunschwäche-Infektion oder Erworbenes Immunschwäche-Syndrom (AIDS) • Hämatopoetische Stammzelltransplantation • Immunsuppressive Therapie bei Organtransplantationsempfängern • Hämatologische Malignome (z. B. Lymphome und Leukämien) • Immunsuppression bei der Chemotherapie von soliden Krebserkrankungen • Systemischer Lupus erythematoses • Sarkoidose • Immunsuppressive oder -modulatorische Therapie bei Autoimmunerkrankungen (Rheumatoid Arthritis, Psoriasis-Arthritis, Psoriasis, juvenile idiopathische Arthritis, entzündliche Darmerkrankungen, Ankylosierende Spondylitis, Multiple Sklerose)

Tabelle 5: Hereditäre und erworbene Krankheiten mit Immundefizienz mit PML-Assoziation. SCID: *Severe Combined Immunodeficiency*. Modifiziert von (Ivan et al., 2017).

Sehr früh wurde ein gemeinsames Merkmal beobachtet, nämlich dass die Behandlung der MS-Patienten mit Natalizumab genauso wie die HIV-Infektion zu einem Rückgang der absoluten CD4⁺ Zahl und des CD4⁺/CD8⁺-T-Zell-Verhältnisses im Liquor führt. Allerdings gilt das gleiche Phänomen nicht für die Blutbahn. Das geänderte T-Zell-Verhältnis im Liquor stellt ein erhöhtes Risiko für opportunistische Infektionen im ZNS auch bei Natalizumab-behandelten Patienten dar. Eine niedrige CD4⁺-Zellzahl im Blut (weniger als 200 Zellen/ μ l) bei paralleler Entwicklung von PML ist bekanntermaßen bei AIDS ein Indikator für einen schlechten zellulären Immunstatus (Stuve et al., 2006).

Manche hereditären Immundefekte können ausschließlich oder bevorzugt einen bestimmten Immunzell-Typ beeinträchtigen, z. B. bei idiopathischer CD4-Lymphopenie (Ivan et al., 2017). Ein ähnlicher Mechanismus findet bei den meisten immunmodulatorischen Therapien statt, die mit der Entwicklung einer PML assoziiert wurden (Ivan et al., 2017). Das typische Beispiel, wie oben erwähnt, ist Natalizumab, das den Eintritt von CD4⁺ T-Zellen in das ZNS effizienter als den Eintritt von CD8⁺ T-Zellen blockiert (Ivan et al., 2017; Stuve et al., 2006). Bei den erworbenen Immundefiziten wie der HIV-Erkrankung ist im Grunde ebenfalls ein Einfluss und Blockiermechanismus von Immunzellen zu beobachten, die zur PML führen. Darüber hinaus wird der CD4-Rezeptor vom HIV-1 benutzt. Diese Interaktion führt sowohl zu quantitativen und qualitativen Veränderungen der CD4⁺ T-Zellen als auch indirekt zum Einfluss der Funktion von CD8⁺ Zellen und der humoralen Immunantwort (Ivan et al., 2017) (s. Tabelle 5).

1.7. Inzidenz der Erkrankung

PML-Inzidenz in verschiedenen Populationen.	
Klinische Entität (nach 1996)	Inzidenz (nach dem Jahr 1996)
Allgemeinbevölkerung	1 pro 200 000 Einwohner
HIV	1,3 pro 1000
Natalizumab (HIV-negativ)	1 pro 1000
Hämatologischen Malignomen	7 pro 10.000 (0,07%)

Tabelle 6: Inzidenz der PML in verschiedenen Populationen modifiziert nach (Bohra et al., 2017; Major et al., 1992).

Die Inzidenz der PML bei MS-Patienten unter Natalizumab-Behandlung übersteigt aktuell die Inzidenz bei HIV-1-infizierten Patienten. Allerdings bleibt sie eine AIDS-definierende Erkrankung (Bohra et al., 2017) (s. Tabelle 6). In einer anderen Studie mit 786 PML-Patienten betrug die Inzidenz der PML für die folgenden Medikamente in abnehmende Reihenfolge: Natalizumab 4,3%, Rituximab 2,9%, Fingolimod 0,53%, Dalfampridin 0,40%, Glatiramer 0,23%, Dimethylfumarat 0,20% und Interferon Beta 0,07% (Oshima et al., 2018).

In einer retrospektiven Studie in den U.S.A. lag der Anteil der neuen PML-Fälle bei Nieren-Transplantierten Patienten unter der Behandlung mit MMF bei 14.4 Fälle pro 100 000 Patienten (Berger, 2010) (s. Tabelle 6).

1.8. PML: Überlebensraten und Behandlungsmöglichkeiten nach der Diagnosestellung

Die PML hat eine hohe Morbidität und Mortalität. Bisher einzige etablierte Möglichkeit der Therapie ist die möglichst rasche Wiederherstellung der Immunkompetenz. Im Falle der HIV-assoziierten PML kann die zeitgerechte Durchführung einer HAART Therapie bei AIDS-Patienten deren Immunfunktion wiederherstellen (Antinori A, Ammassari 2001), eine PML im frühen Stadium verhindern oder auch eine bereits manifestierte PML stabilisieren und teilweise den neurologischen Symptomen verbessern. Dasselbe gilt für Patienten, die sich unter immunmodulatorischen Therapien befinden. Nach einer frühzeitigen Diagnose der PML sind die wesentlichen therapeutischen Maßnahmen das Absetzen der medikamentösen Therapie, ggf. eine Plasmapherese (Plasmaaustausch) zur schnelleren Eliminierung des Natalizumab aus der Blutbahn. Die schnelle Plasmapherese trägt zu dem Überleben des Patienten und der neurologischen Stabilisierung bei (Berger, 2014; Casado et al., 2014; Engsig et al., 2009).

Das Auftreten von IRIS (*Immune reconstitution inflammatory syndrome*), z. B. bei den AIDS-Patienten, die mit einer HAART-Therapie beginnen oder bei den Natalizumab-behandelten MS-Patienten nach der Plasmapherese, beinhaltet die Wiederherstellung der Immunfunktionen, was allerdings zu einer fulminanten entzündlichen Reaktion im Bereich der PML-Läsion führt (Ivan et al., 2017). Eine zusätzliche Verschlechterung der radiologischen und klinischen Befunde bei einer Infektion ist typisch bei Auftreten von IRIS.

Dementsprechend werden parallel zur unterstützenden Therapie und dem Plasmaaustausch die Patienten mit Kortikosteroiden behandelt, um das IRIS zu verhindern, obwohl der Nutzen dieses Vorgehens umstritten ist (Williamson and Berger, 2015).

Unter den Natalizumab-assoziierten PML-Überlebenden ist die Mehrheit von Patienten schwer betroffen (Lima et al., 2010; Vermersch et al., 2011).

1.8.1. Antivirale Therapie

Derzeit gibt es kein spezifisches antivirales Medikament gegen das JCV. Viele antivirale Medikamente, die gegen JCV eine Wirkung haben sollen, wurden *in vitro* untersucht und in einzelnen Fällen oder in kleineren klinischen Studien getestet (Ferenczy et al., 2012; Ivan et al., 2017):

- Die **Serotonin-Rezeptor-Antagonisten**, die den sekundären Rezeptor des JCV Serotonin- Rezeptor 2A (5HT_{2A}R) blockieren, werden empirisch getestet und derzeit angewendet (Ferenczy et al., 2012). Das Chlorpromazin blockiert die Virusinfektion *in vitro*, wurde aber nie klinisch getestet. Das Mirtazapin scheint in einigen PML-Fallstudien eine Wirkung gezeigt zu haben (Ivan et al., 2017).
- **Cidofovir**, ein azyklisches Nukleotidphosphatanalogon von Desoxycytosinmonophosphat und insbesondere sein Prodrug Brincidofovir, das zur Behandlung von Zytomegalievirus-Retinitis eingesetzt wird, zeigen eine antivirale Aktivität hauptsächlich gegenüber nichthumanen Polyomaviren, indem sie ihre Replikation unterdrücken. Allerdings verbessert es weder die Klinik noch die Prognose der PML-Patienten (Ferenczy et al., 2012).
- **Mefloquin**, ein Medikament zur Vorbeugung oder Behandlung von Malaria, wurde als potenzieller JCV-Inhibitor in einem Hochdurchsatz-Screening von bereits zugelassenen Medikamenten entdeckt und kann die DNA-Replikation in den Wirtszellen blockieren (Ferenczy et al., 2012; Ivan et al., 2017).

Allerdings war bisher kein geeignetes Tier-Model für eine PML- oder JCV-Infektion verfügbar und trotz der *in vitro* Wirksamkeit bestimmter Therapeutika bezüglich einer Verringerung der JCV-Replikation, wie beim Mefloquin und Cidofovir gezeigt, wurde in randomisierten kontrollierten Studien keine Wirksamkeit bewiesen (Brickelmaier et al., 2009; Clifford et al., 2013; Ivan et al., 2017).

1.8.2. Impfstoff

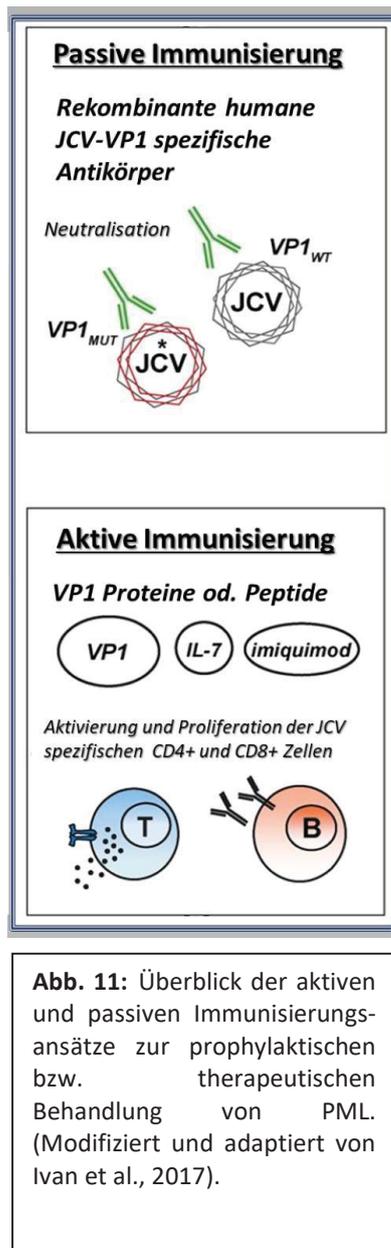


Abb. 11: Überblick der aktiven und passiven Immunisierungsansätze zur prophylaktischen bzw. therapeutischen Behandlung von PML. (Modifiziert und adaptiert von Ivan et al., 2017).

1.8.2.1. Aktive Immunisierung

Die Entwicklung von prophylaktischen Impfstoffen könnte mittels virusähnlichen Partikeln (virus like particles, VLP) ein vielversprechender Ansatz sein (Ivan et al., 2017; Schiller and Lowy, 2015). Dennoch ist die präzise VP1-VLPs-Zusammensetzung als auch das richtige Adjuvans für einen wirksamen Impfstoff, der durch den Zusammenbau von JCV VP1-Proteinen gebildet wird, noch nicht abschließend geklärt. Ein wirksamer Impfstoff sollte eine Kombination von VP1-Epitopen in unterschiedlicher struktureller Anordnung enthalten, die optimal für die Aufnahme durch antigenpräsentierende Zellen und weiterhin für die Auslösung der richtigen humoralen Immunantwort sind (Ivan et al., 2017).

Ein interessanter Ansatz von JCV-VP1-VLPs und Imiquimod, einem Toll-like-Rezeptor-7 (TLR7)-Agonisten wurde an drei PML-Patienten unter Immunsuppression und Grunderkrankungen angewendet (s. Abb. 11). Der Impfstoff führte zu einer Senkung der absoluten Viruslast, der ausgeprägten Proliferation von VP1-spezifischen CD4⁺ T-Zellen und Produktion von Anti-JCV-Stamm-gezielten

neutralisierenden-Antikörpern bei allen Patienten (Ivan et al., 2017; Ray et al., 2015; Sospedra et al., 2014). Parallel zu den Laborbefunden besserten sich die MRT-Aufnahmen der Patienten durch eine Kontrastverstärkung der PML-Läsionen als Zeichen einer lokalen Immunantwort und eines IRIS zu sehen. Im Anschluss verbesserte sich auch ihr neurologisches klinisches Bild (Ivan et al., 2017; Sospedra et al., 2014). Derzeit steht das IL-7 als Bestandteil des endgültigen Impfstoffs zur Diskussion. Dieser Erfolg zeigt, dass der obengenannte VLPs-Ansatz vielversprechend ist (Ivan et al., 2017).

1.8.2.2. Passive Immunisierung

Die neutralisierenden Antikörper der humoralen Immunantwort scheinen keinen ausreichenden Schutz zu vermitteln, sondern werden vielmehr als Reaktion auf die ansteigende Viruslast bei Patienten mit Polyomavirus-assoziierten Erkrankungen gewertet (Gorelik et al., 2010; Major et al., 2018). Dies könnte zum Teil darauf zurückzuführen sein, dass die krankheitsassoziierte virale VP1-Mutanten der Antikörperneutralisation im Sinne eines Immunescares entgehen können (Jelcic et al., 2015; Pastrana et al., 2012; Ray et al., 2015)

Die humorale Immunantwort gegen das JCV und vor allem gegen die mutierten JCV-Varianten bei Natalizumab-assoziierten PML-Patienten ist beeinträchtigt (Jelcic et al., 2015). Entsprechend führte die nach dem Absetzen der Therapie initiierte Immunrekonstitution der Patienten in einer Studie zu einer erweiterten und gleichzeitig gezielten IgG-Antikörper-Produktion gegen die PML-assoziierten JCV-Varianten (Ivan et al., 2017; Jelcic et al., 2015).

Die gezielte Antikörper-Produktion parallel zu der Immunrekonstitution eines PML-Patienten wurde von Jelcic und Kollegen erfolgreich genutzt: mittels Rekombination von B-Zell-Klonen gesunder Spender und B-Zell-Klonen eines PML-Patienten, der die Virusinfektion nach IRIS erfolgreich kontrolliert und sich von der PML erholt hatte, wurden hochwirksame neutralisierende Anti-VP1 spezifische JCV Antikörper generiert (Ivan et al., 2017; Jelcic et al., 2015). Diese humanen Antikörper zeigten eine erhöhte Spezifität und Affinität zum JCV. Sie neutralisierten *in vitro* die JCV-Infektion und interessanterweise wiesen sie eine Kreuzreaktivität gegen die häufigsten PML-JCV-Varianten auf (s. Kapitel 1.2.6.4.) (Ivan et al., 2017; Jelcic et al., 2015).

Folglich scheinen die rekombinanten Antikörper in Form einer passiven Immunisierung therapeutisch vielversprechend zu sein, insbesondere für Patienten, bei denen eine sofortige Immunrekonstitution nicht möglich ist (z.B. HIV, Transplantation oder immunsuppressive Therapie) (Ferenczy et al., 2012; Ivan et al., 2017).

1.9. Prognose und Mortalität

Die Natalizumab-assoziierte PML weist heutzutage eine Mortalität von 21% auf, wobei die Morbidität dennoch weiter hoch ist (Dong-Si et al., 2015; Vermersch et al., 2011). Eine relativ bessere Prognose der Krankheit ist mit jüngerem Alter, einer geringen neurologischen Pre-PML-Behinderung, geringerer Viruslast im Liquor und meistens mit fokaler Gehirnbeteiligung verbunden (Dong-Si et al., 2015).

Auf der anderen Seite ist die Prognose bei AIDS-assoziiierter PML direkt von der CD₄⁺-Zahl abhängig und weist eine erhöhte Mortalität zwischen 50% und 80% auf (Casado et al., 2014).

1.10. Risikostratifizierung von PML im Zusammenhang mit Natalizumab-Gabe

Das Einschätzen des Risikos von PML im Zusammenhang mit der Behandlung mit Natalizumab basiert derzeit auf drei Faktoren (Biogen GmbH and PEI, 2017a; Sorensen et al., 2012)):

1. dem JCV-Serostatus des Patienten, nämlich dem Vorhandensein von Anti-JCV-Antikörpern, wie auch die Höhe der Anti-JCV-Antikörperantworten (sog. JCV-Indexwerte)
2. einer vorherigen Immunsuppression bzw. einer Behandlung mit Immunsuppressiva vor der Behandlung mit Natalizumab
3. der Dauer der Behandlung mit Natalizumab. Eine Behandlung bis zu 2 Jahren ist mit einem geringeren Risiko verbunden.

(EU, 2016b; Fox and Rudick, 2012; Gupta and Weinstock-Guttman, 2014; Major, 2010; Tyler, 2010; Volz-Zang et al., 2016).

Die regelmäßige MRT-Überwachung wird bei Patienten mit hohem Risiko empfohlen, da die Erstdiagnose mittels MRT beim asymptomatischen Patienten mit besserer Prognose verbunden sein kann. Bei neu auftretender neurologischer Symptomatik der behandelnden Patienten sind die Empfehlungen für die MRT-Überwachung einmal jährlich bzw. alle 3–6 Monate bei Fällen mit höherem PML-Risiko festgelegt worden (s. Abb. 12) (Biogen GmbH and PEI, 2017b; EU, 2016a) .

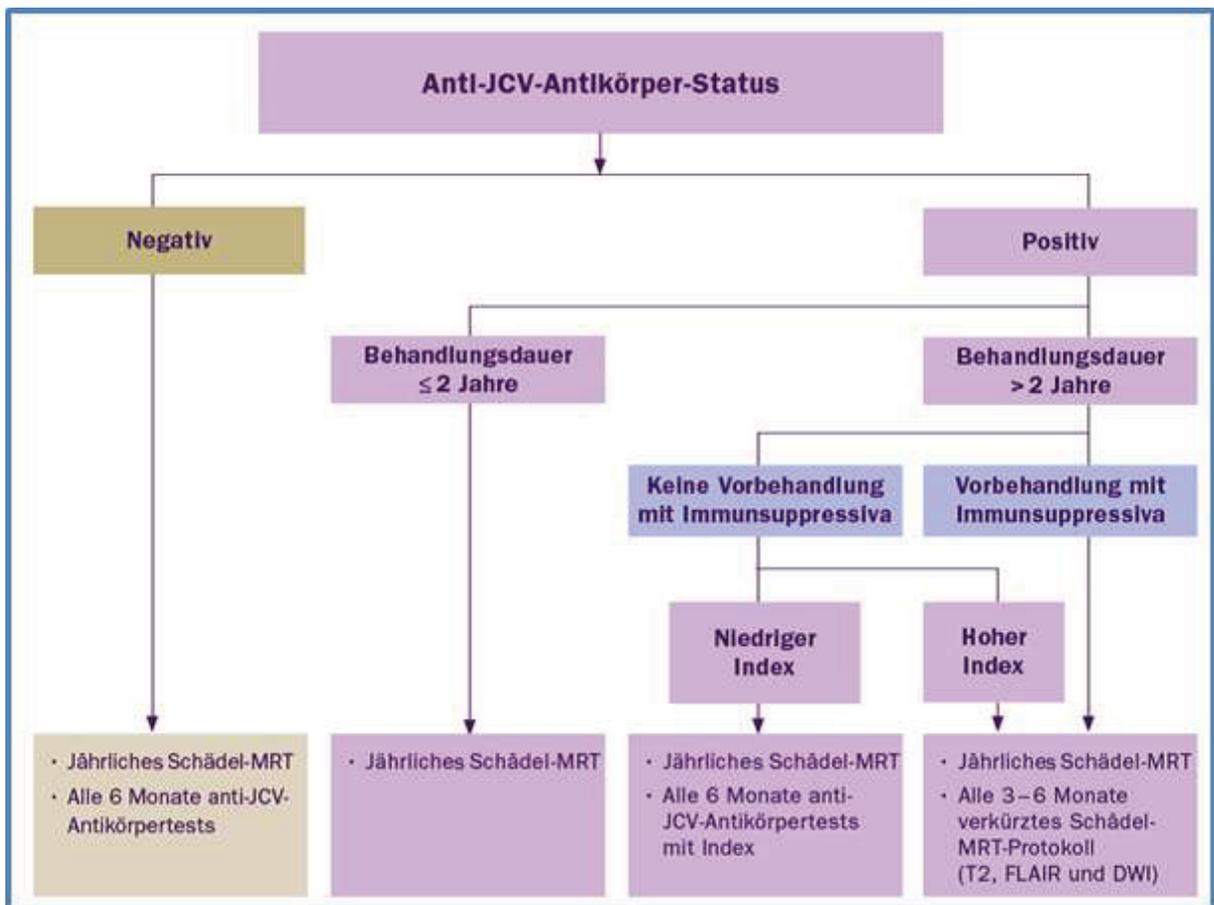


Abb. 12: Die empfohlene Patientenüberwachung für Multiple Sklerose-Patienten, die TYSABRI® erhalten. Adaptiert und modifiziert von Schulungsmaterial, Biogen-PEI, 2017 (Biogen GmbH and PEI, 2017b).

1.11. Fragestellung der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurden Proben von PML-Patienten, verfügbar am Institut für Virologie, HHU, untersucht. Das PML-Patienten-Kollektiv bestand aus diagnostizierten PML-Fällen unter Therapie mit zugelassenen biologischen Medikamenten, sowie weitere Immunsuppressions-Bedingungen und in manchen Fällen auch Tumor-Therapien dokumentiert worden waren. Die Ziele dieser Dissertation waren:

1. Die molekulare Analyse der JCV-Stämme von PML-Patienten im Liquor, Hirnbiopsie, Blut, Knochenmark und Urin, je nach Verfügbarkeit der Biomaterialien. Die Analyse betraf die ‚*Rearrangements*‘ in der nicht kodierenden Region NCCR, die für die Steuerung der viralen Replikation und Translation verantwortlich ist, als auch Mutationen im JCV-VP1-Gen, die zu Aminosäuresubstitutionen geführt haben und anschließend ‚Struktur-Funktions‘-Phänomene in der LSTc-Bindungstasche des Virus im Vergleich zu dem Wildtyp verursacht haben könnten.

2. Die Einordnung der Befunde in den Kontext der Literatur mit der Frage, in welchem Kompartiment (z.B. in der Peripherie, der Blutbahn oder lokal im ZNS) die virusgenetischen Veränderungen und vor allem die VP1-Mutationen beim Archetyp zuerst erscheinen. Wichtig war es ebenfalls zu klären, welche Bedeutung eine PML-assoziierte-VP1-Mutation für das Virus hat und ob diese Mutation laut der Theorie des Selektionsdrucks, die Entwicklung der Erkrankung begünstigt. Dies könnte Rückschlüsse auf die Pathogenese der PML bzw. das relevante Reservoir der Infektion mit JCV erlauben.

3. Die Korrelation zwischen der Viruslast und Virusgenetik mit klinischen Parametern wie zugrundeliegende Grunderkrankung (HIV, Immuntherapie mit Natalizumab) und klinischem Verlauf der PML.

4. Die Detaillierte Betrachtung und Sequenzierung verfügbarer Proben eines Patienten aus der Kinderhämatologie mit ungewöhnlich hohen Viruslasten vor allem im Liquor, bei dem klinische und MRT-Zeichen einer PML fehlten.

Technische Voraussetzung und ein großer Teil der Arbeit bestand darin, PCR- und Sequenzier-Protokolle zu etablieren und zu optimieren, um valide Aussagen zu dem Zusammenhang von gefundenen Mutationen und deren Bedeutung treffen zu können. Dies bezieht sich sowohl auf die interindividuellen Unterschiede (zwischen verschiedenen Patienten) wie auch auf intraindividuelle Unterschiede (zwischen verschiedenen Biomaterialien z.B. Blut und Liquor; zu unterschiedlichen Zeitpunkten beim einzelnen Patienten).

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Patientenproben

Patient	Name Verschlüsselt, Geschlecht	Probe-Nr.:	Material (Vl)	Eingang	Viruslast (K/ml)	Diagnose			
1	T356, w	1	Liquor (4803)	2015-01-30	55700	V.a.PML			
		2	Serum (4804)	2015-01-30	18300				
		3	Liquor (648)	2015-01-06	17158322				
		4	Liquor (7809)	2015-02-19	6818				
		5	Serum (7810)	2015-02-19	34695				
		6	Liquor (16131)	2015-04-09	4160				
		7	Serum (26099)	2015-06-12	40				
		8	Liquor (26098)	2015-06-12	2062				
		9	Serum (45242)	2015-10-09	2062				
		10	Liquor (45241)	2015-10-09	negativ				
2	S9H6, m	11	EDTA-Blut (8844)	2015-02-25	negativ	Z.n. Rituximab			
		12	EDTA-Blut (10057)	2015-03-04	negativ				
		13	Liquor (12422)	2015-03-17	295000				
		14	Liquor (16136)	2015-04-09	604000				
		15	Liquor(19234)	2015-04-28	1370000				
		16	Liquor (12422)	2015-03-17	295000				
		17	Liquor (14932)	2015-04-01	924000				
3	D0I9, w	18	Liquor (7038)	2015-02-13	64	V.a.PML			
		19	Serum (13465)	2015-03-13	7020				
		20	Liquor (13464)	2015-03-13	140				
		21	Serum (18903)	2015-04-27	12500				
		22	Liquor (18902)	2015-04-27	390				
		23	Liquor (25819)	2015-06-11	734484				
		24	Serum (25820)	2015-06-11	53104				
4	B506, m	25	Serum (49062)	2015-11-02	45	V.a.PML			
		26	Liquor (49061)	2015-11-02	27				
		27	Liquor (43798)	2015-09-30	220				
		28	Serum (43799)	2015-09-30	negativ				
		29	Serum (23880)	2015-05-28	1350				
		30	Liquor (23879)	2015-05-28	4980				
5	S0R6, m	31	Serum (20906)	2015-05-09	880	V.a.PML			
		32	Serum (30206)	2015-07-08	68110				
		33	Liquor (30205)	2015-07-08	4897				
6	S7B6, w	34	Serum (19962)	2015-05-04	390	PML - MS unter Tysabri seit 2006			
		35	Liquor (19961)	2015-05-04	304455				
		36	Liquor (19856)	2015-05-04	298920				
		37	Serum (19855)	2015-05-04	270				
		38	Serum (26921)	2015-06-17	229				
		39	Liquor (26920)	2015-06-17	1293				
		40	Liquor (31895)	2015-07-17	79				
		41	Serum (31896)	2015-07-17	28				
		7	E655, m	42	Serum (35357)		2015-08-07	4865	Z.n. Rituximab
				43	Liquor (35340)		2015-08-07	508400	
8	R6R7, w	44	Liquor (40546)	2015-09-09	2130	V.a.PML			
		45	Serum (40547)	2015-09-09	132				
		46	Serum (46029)	2015-10-14	1620				
		47	Liquor (46030)	2015-10-14	1290				
9	E9R9, w	48	Serum (11106)	2015-03-10	33000	V.a.PML bei Tysabri			
		49	Liquor (11098)	2015-03-10	6920				
		50	Serum (15832)	2015-04-08	negativ				
		51	Liquor (15833)	2015-04-08	4680				
		52	Serum (47356)	2015-10-22	351				
10	C4C7, m	53	Liquor (47355)	2015-10-22	13841	PML, MS seit 1994			
		54	Liquor (42782)	2015-09-23	20760				
		55	Liquor (52989)	2015-11-26	32				
		56	Liquor (52996)	2015-11-26	102				
		11	E7R6a, w	57	Liquor (49317)		2014-12-04	118	NHL Z.n Rituximab
				58	Serum (49316)		2014-12-04	negativ	
59	Liquor (35)			2015-01-02	77				
60	Serum (36)			2015-01-02	negativ				
61	Liquor (11568)			2015-03-12	390				
62	EDTA-Blut (11569)			2015-03-12	2460				
12	E7R6b, w	63	EDTA-Blut (48954)	2015-11-02	516	HIV/PML			
		64	Liquor (52858)	2015-11-26	1835				
		65	Liquor (3831)	2016-01-22	390				
		66	Serum (3832)	2016-01-22	330				
		67	Serum (14052)	2015-03-26	1440				
13	E7R9, w	68	Liquor (14051)	2015-03-26	4140	V.a.PML			
		69	Serum (6802)	2016-02-10	1050				
14	E9L4, m	70	Hirnbiopsie (6115)	2016-02-15	351000000	V.a.PML			
		71	Liquor (41876)	2016-09-09	76950				
15	N556, w	72	Serum (41877)	2016-09-09	12180	V.a.PML			
		73	Liquor (12572)	2016-03-14	941				
16	H8I9, w	74	Serum (12573)	2016-03-14	46653	V.a.PML			
		75	Serum (29277)	2015-07-02	605				
17	N0R6, m	76	Liquor (29276)	2015-07-02	10979275	V.a.PML			
		77	Serum (7596)	2015-02-18	630				
18	N8R5, w	78	Liquor (7595)	2015-02-18	82700	V.a.PML			
		79	Liquor (50629)	unbekannt	12165				
19	L0T5, w	80	Liquor (42680)	2015-09-23	2250	V.a.PML			
		81	Liquor (48159)	2015-10-27	3585				
20	L8N6, m	82	Serum (48213)	2015-10-27	405	V.a.PML			
		83	Liquor (46538)	2012-12-11	4920				
21	E7H5, w	84	Liquor (14122)	2013-03-27	1189478	Hyper-IgE Syndrom, JCV-Proliferation ohne PML			
		85	Liquor(7878)	2013-02-19	698010				
		86	Liquor (21758)	2013-05-15	584000				
		87	Liquor (1036)	2013-01-08	242805				
		88	EDTA-Blut (3242)	2013-01-22	1450000				
		89	EDTA-Blut (9135)	2013-02-26	88680				
		90	EDTA-Blut (10945)	2013-08-03	2299800				
		91	EDTA-Blut (17023)	2013-04-15	5000000				
		92	EDTA-Blut (19601)	2013-04-30	520470				
		93	EDTA-Blut (25642)	2013-06-11	2377800				
		94	Urin (46098)	2012-11-06	511200000				
		95	Urin (693)	2013-01-07	1130000000				
		96	Urin (3052)	2013-01-21	156300000				
		97	Urin (5810)	2013-02-06	76800000				
		98	Urin (7280)	2013-02-15	642000000				
		99	Urin (14076)	2013-03-27	85800000				
		100	Urin (21663)	2013-05-14	1788000000				
		101	Urin (32615)	2013-07-29	75780				
		102	Urin (2224)	2013-01-16	110100000				
		103	Urin (5810)	2013-02-06	76800000				
		104	KnochenMark (14121)	2013-03-27	61140				

Tabelle 7: Das Patientenkollektiv der vorliegenden Dissertation. VI: Labornummer der untersuchten Patienten.

In diesem Teil der Studie wurden insgesamt 103 Patientenproben ausgewertet. Diese Proben umfassten Liquor-, Serum-, Urin- Biopsien, und Knochenmarkproben von 21 Patienten, die nach der Optimierung der entsprechenden PCR-Methoden amplifiziert, sequenziert und ausgewertet wurden. Die Zusammensetzung des Kollektivs der virologischen Patientenproben sind nach Namen-Verschlüsselung gemäß RKI-Vorgaben (Landesuntersuchungsanstalt_Sachsen; and RKI, 2006) in der Tabelle 7 gezeigt.

Die Proben stammen aus durchgeführten Untersuchungen von Patienten der Universitätskliniken Düsseldorf als auch anderer deutschen Kliniken und aus dem Ausland, die in das Institut für Virologie-UKD eingesandt worden waren.

Zur Verwendung des Patientenmaterials lag ein Ethikvotum durch die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität unter der Nummer: (4992, 24.02.2015) vor.

Als Referenzsequenz für die Optimierung der Methoden und Auswertung der jeweiligen Mutationen wurde das JCV Mad-1 Genom aus der Genbank mit Eintragsnummer J02226.1/ *NCBI-Reference-Sequence*: NC_001699.1 verwendet (Frisque et al., 1984; NCBI, 2000). Nachfolgend werden die verwendeten Primer, Kits und PCR-Protokolle aufgeführt.

2.1.2. PCR-Primer

2.1.2.1. Sequenzen der verwendeten PCR-Primer

Weiter unten in der Tabelle 8 und teilweise in der Abbildung 13 sind die insgesamt 31 Primer aufgeführt, die in dieser Dissertation verwendet wurden. 21 Primer sind mit der Abkürzung ‚VP1‘ (Virales Protein 1) bezeichnet und betreffen die PCR-Versuche zur Amplifikation des VP1-Genbereichs. Gleichfalls sind 10 Primer mit der Abkürzung NCCR bezeichnet und wurden in der ‚*nested*‘ PCR-Analyse des NCCR-Genbereichs eingesetzt: zwölf Primer wurden bereits in der Literatur publiziert und zwei davon wurden hier modifiziert eingesetzt. (Monaco et al., 1998; Reid et al., 2011; Van Loy et al., 2015).

Primer	Sequenz	Quelle
VP1-Fw1	5' GGCCCCAACAAAAAGAAAAGG 3'	In house
VP1-Fw2 *	5' GCTTTAGAATTACAGGGGGTG 3'	In house
VP1-Rev1 **	5' GAAAGCTGGTGCCCTGCAC 3'	In house
VP1-Rev2	5' CAGCATTTTTGTCTGCAACTGTCC 3'	In house
VP1-For3 †	5' CCCCAAATGTGCAATCTGG 3' (B)	In house
VP1-Rev4 †	5' GGCCAGTTGCTGACTTTGC 3' (B)	In house
VP1-For4 †	5' GCAGCCAGCTATGGCTTTAC 3' (A)	In house
VP1-Rev3 †	5' CTCTGGTGCAGACACACAG 3' (A)	In house
VP1- Fw5	5' CCAATGATGTTGCCTTTAC 3'	modifiziert nach (Reid <i>et al.</i> 2011)
VP1- Rev5	5' ATGTTTCAAAAAACCAAAGACC 3'	modifiziert nach (Reid <i>et al.</i> 2011)
VP1-Fw7	5' GGCAAGCAACTCATGACAATG 3'	In house
VP1-Rev6 ***	5' CATGACTTGAGATTGCACTGTG 3'	In house
VP1-Fw6 ***	5' CACAGTGAATCTCAAGTCATG 3'	In house
VP1-Fw8 **	5' GTGCAGGGCACCAGCTTTC 3'	In house
VP1-Rev8 *	5' CACCCCTGTAATTCTAAAGC 3'	In house
NCCR1	5' AGGCCTAATAAATCCATAAGCTCCA 3'	In house
NCCR2	5' GTTCCACTCCAGGTTTTACTAACTT 3'	In house
NCCR3	5' CATTITAGCTTTTTGCAGCAAAAAATTA 3'	In house
NCCR4	5' CTGGCGAAGAACCATGGCCAG 3'	In house
VP1-Reid-F	5' CCTCAATGGATGTTGCCTTT 3'	(Reid <i>et al.</i> 2011)
VP1-Reid-R	5' AAAAC-CAAAGACCCCTC 3'	(Reid <i>et al.</i> 2011)
NCCR-Reid-F	5' GATTCCTCCCTATTCAGCACTTTG 3'	(Reid <i>et al.</i> 2011)
NCCR-Reid-R	5' TCCACTCCAGGTTTTACTAA 3'	(Reid <i>et al.</i> 2011)
VP1 TVL-F1	5'CTTTACTTTTAGGGTTGTACGGGAC 3'	(Van Loy <i>et al.</i> 2013)
VP1 TVL-F2	5' TGAGGATCTAACCTGTGGAA 3'	(Van Loy <i>et al.</i> 2013)
VP1 TVL-R1	5' CTCCCCAAAATAACTGCAACT 3'	(Van Loy <i>et al.</i> 2013)
VP1 TVL-R2	5' TCCTCTCCACTGCTGGGA 3'	(Van Loy <i>et al.</i> 2013)
NCCR RG1-F	5' CCCTATTCAGCACTTTGTCC 3'	(Monaco <i>et al.</i> 1998)
NCCR RG1-R	5' CAACCACTGTGTCTCTGTC 3'	(Monaco <i>et al.</i> 1998)
NCCR RG2-F	5' GGAATTCCTGGCCTCCT 3'	(Monaco <i>et al.</i> 1998)
NCCR RG2-R	5' ACTTTCACAGAAGCCTTACG 3'	(Monaco <i>et al.</i> 1998)

Tabelle 8: Dargestellt sind alle verwendeten Primer dieses Projekts. Der erste Bestandteil des Namens bezeichnet den Genbereich von VP1 bzw. NCCR: **Tm:** Schmelzpunkt der Primersequenzen („Melting Temperature“ od. „Annealing Temperature“); **†:** Diese Primer haben das VP1 in 2 Teilen; **„A“** und **„B“** halbiert und erfolgreich amplifiziert; ***** / ****** / *****:** Die Ziel-DNA wurde in beiden Richtungen (5'-3' und 3'-5' bzw. „Forward“ und „Reverse“ Primer) in konventionellen als auch Sybr-Green semiquantitativen Thermalprotokollen in den aufgeführten Kombinationen (weiter unten) mit Hilfe dieser Primer sequenziert. Alle Primer wurden von Biomers GmbH hergestellt.

>JCV-CompleteVirus (J02226.1/ NC_001699.1)

gcctcggcctcctgtatatataaaaaaaaggggaaggatggctgccagccaagcatgagc
tcatacctagggagccaaccagctaacagccagtaaacaaagcacaaggctgtatatata
aaaaaaaggggaaggatggctgccagccaagcatgagctcatacctagggagccaaccag
ctaacagccagtaaacaaagcacaaggggaagtggaaagcagccaagggaacatgttttg
cgagccagagctgttttggcttgcaccagctggccatgggtctctcgccagctgtcacgt
aaggcttctgtgaaagttagtaaaacctggagtggaactaaaaaaagagctcaaaggatt
ttaattttttgttagaatttttgcctggacttttgcacaggtgaagacagtgtagacggg
aaaaaaagacagagacacagtggtttgactgagcagacatacagtgctttgctgaacca
aaagctacataggttaagtaattttttttgtgttttcaggttcatgggtgccgcaactt
gcacttttgggggacctagttgctactgtttctgaggtgctgctgccacaggattttca
gtagctgaaattgctgctggagaggctgctgctactatagaagttgaaattgcatccctt
gctactgtagaggggattacaagtacctctgaggctatagctgctataggccttactcct
gaaacatagctgtaataactggagctccgggggctgtagctgggtttgctgcattgggt
caaactgtaactgggtgtagtgctattgctcagttgggatatagattttttgctgactgg
gatcataaagtttcaacagttgggctttttcagcagccagctatggctttacaaattttt
aatccagaagactactatgatattttttctctggagtgaaatgcctttgttaacaatatt
cactatttagatcctagacattggggcccgctccttgttctccacaatctcccaggctttt
tggaatctgttagagatgatttgccagccttaacctctcaggaaattcagagaagaacc
caaaaactatttgttgaaagtttagcaaggtttttggaagaaactacttgggcaatagtt
aattcaccagctaacttatataattatatttcagactattattctagattgtctccagtt
aggcctctatgtaaggcaagttgcccaagggaggggaacctatatttcttttggccac
tcatacacccaagatagatgtagcagacagcattcaagaagttacccaaggctagat
ttaaaaa**ccccaaatgtgcaatctggg**tgaaatttatagaagaagattgaccaggaggt
gcaaatcaagatctgct**cctcaatggatgttgcctttacttttagggttgtacgggac**t
gtaacacctgctcttgaagcatatgaagat**ggccccaacaaaaagaaaagg**agaaaggaa

VP1-For4

VP1-For3

VP1-For5; VP1-Reid-F

VP1 TVL-F1; VP1-

Fw1

ggaccccgtgcaagttccaaaacttcttataagaggaggagtagaagttctagaagttaa
aactgggggtgactcaattacagaggtagaatgctttttaaactccagaaatgggtgaccc
agatgagcatcttaggggttttagtaagtcfaatcttatatcagatacatttgaaagtga
ctccccaaatagggacatgcttccctgttacagtggtggccagaattccactaccaatct
aaa**tgaggatctaactgtggaa**atatactcatgtgggaggtgtagaccttaaaaactga
ggttataggggtgacaagtttgatgaatgtgcactctaattg**ggcaagcaactcatgacaa**
tggtgacaggggaagcca**gtgcagggcaccagctttc**atttttttctgttgggggggag**gc**
tttagaattacaggggtgctttttaaattacagaacaaagtaccagatggaacaatttt
tccaaagaatgc**cacagtgcaatctcaagtcacg**aacacagagcacaaggcgtacctaga
taagaacaaagcatalctctgttgaaatgttgggttctctgatcccaccagaaatgaaaacac
aagatattttgggacactaacaggaggagaaaatgttccctccagttcttcataatacaaa
cactgccacaacagtggttgccttgatgaatttgggtgttggggcactttgcaaaggtgacaa
cttataacttgcagctgttgatgctgctggtgctttacaacaggctctggt**tcccagca**
gtggagaggactctccagatatttttaaggtgcagcctaaggaaaaggagggttaaaaacc
ctaccaatttcttctcttactgatttaattaacagaaggactcctagagttgatgg
gcagcctatgtatggcatggatgctcaagtagaggaggttagagtttttgagggaacaga
ggagcttccaggggacccagacatgatgagatacgttgacaaatat**ggacagttgcagac**
aaaaatgctgtaatacaaaagcctttattgtaatatgcagtacatttttaataaagtataac
cagctttacttaac**agttgcagttattttgggggaggggtctttggttttttgaaac**att

VP1 TVL-F2

VP1-FW7

VP1-Rev1 = VP1-Fw8

VP1-FW2 = VP1-Rev8

VP1-Fw6 = VP1-Rev6

VP1-TVL-R2

VP1-Rev2

VP1-TVL-R1; VP1-

Rev5

gaaagcctttacagatgtgaaaagtgcagttttc**ctgtgtgtctgcaccagag**gcttctg
agacctgggaaaagcattgtgattgtgattcagtgcttgatccatgtccagagctctctg
cttcagaatcttctctctaggaagtcaagaatgggtctccccataccaacattagctt
tcatagtagaaaatgtatacatgcttattttctaaatccagcctttctttccactgcacaa
tctctcatgaatggcagct**gcaagtcagcaactggcc**taaacagattaaaagcaaaa
gcaaagtcataccactttgcaaaatcctttttctagcaaaatactcagagcagcttagtg
attttctcagtgagcctttggctcaaaatctatctgccttacaatactggcctgttaaag
ttctaggcactgaatattcattcattggttacaattccaggtggaacacctgtgttctt
tgttttgggtgttttctctcaaatcaacttttacacttccatctaaagtaattctcttaagc
aatcaaggttgcttatgccatgccctgaaggtaaatcccttgactctgcaccagtgctt
ttacatectcaatacaaccataaactgatctataccactcctaattcaaagtttaate
tttctaattggcatattaacatttaattgactttccccacagagatcaagtaagctgcag
ctaaagtagtttggcactgtctattggccccttgaatagccagtacctttttttggaa
tgtttaatacaatgcatttttagaaagtcataaataacagtggtccatttgaggcagcaagc
aatgaatccagggccaccagccatataattgctctaaaacagcattgccatgtgcccac
aaattaagtcattttatcaagcaagaatataaacctttcaactaacatttctctctg

VP1-Reid-R

VP1-Rev3

VP1-Rev4

tcattgtggatgctgtcaaccctttgtttggtgctacagtatcaacagcctgctggcaaa
 tgcttttttgatttttgctatctgcaaaaatttgggcattataatagtgtttttcatgat
 ggtaaagtgatttggtgatcctttttttcacattttttgcattgctgtgggttttct

Abb. 13: Ausschnitt aus dem JCV-Genom, der die Genregion JCV-VP1 umschließt. In dem grauen Bereich befindet sich das Gen VP1 (1469-2533pb). Unterstrichen sind die verwendeten Primer, die für die Sequenzierung des VP1-Gens dienen.

≡ : Die Ziel-DNA wurde in beiden Richtungen (5'-3' und 3'-5' bzw. ‚Forward‘ und ‚Reverse‘) in konventionellen als auch Sybr-Green semiquantitativen Thermalprotokollen in den aufgeführten Kombinationen (weiter unten) mit Hilfe dieser Primer sequenziert. Die Primer sind unterstrichen oder rot bzw. grün im JCV-Genom (J02226.1) markiert (Frisque et al., 1984; Monaco et al., 1998; NCBI, 2000; Reid et al., 2011; Van Loy et al., 2015).

2.1.2.2. Sequenzen der experimentell optimierten Primer

Primer	Sequenz	Hersteller	Quelle
VP1 Reid-F	5' CCTCAATGGATGTTGCCTTT 3'	biomers	(Reid et al. 2011)
VP1 Reid-R	5' AAAACCAAAGACCCCTC 3'	biomers	(Reid et al. 2011)
VP1 TVL-F1	5' CTTTACTTTTAGGGTTGTACGGGAC 3'	biomers	(Van Loy et al. 2013)
VP1 TVL-R1	5' CTCCCCAAAATAACTGCAACT 3'	biomers	(Van Loy et al. 2013)
NCCR RG1-F	5' CCCTATTCAGCACTTTGTCC 3'	biomers	(Monaco et al. 1998)
NCCR RG1-R	5' CAAACCACTGTGTCTCTGTGC 3'	biomers	(Monaco et al. 1998)
NCCR RG2-F	5' GGGAATTTCCCTGGCCTCCT 3'	biomers	(Monaco et al. 1998)
NCCR RG2-R	5' ACTTTCACAGAAGCCTTACG 3'	biomers	(Monaco et al. 1998)

Tabelle 9: Die optimalen Primer für die Amplifikation des JCV-VP1 und der NCCR. F: *Forward*, R: *Reverse* (Monaco et al., 1998; Reid et al., 2011; Van Loy et al., 2015).

2.1.3. Verwendete Polymerasen und PCR Kits

PCR Kit	Polymerase	Hersteller-Referenz
<i>Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase</i>	Phusion DNA-Polymerase	New England Biolabs (NEB, 2018a)
<i>Phusion High-Fidelity PCR Master Mix -F548S</i>	Phusion DNA-Polymerase	New England Biolabs /ThermoFischer Scientific (NEB, 2018b)
<i>Herculase II Fusion DNA Polymerase</i>	Herculase II Fusion DNA Polymerase	(Agilent Technologies Inc., 2013; Reid et al., 2011)
<i>PWO DNA Polymerase</i>	PWO DNA Polymerase	SigmaAldrich-Roche; (Roche, 2013)
<i>Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix</i>	SureStart Taq® DNA polymerase	Agilent Technologies Inc 2015 (Agilent, 2012)

Tabelle 10: Verwendete PCR-Kits, DNA-Polymerasen und deren Referenzen.

2.1.4. Weitere Chemikalien

Chemikalien	Hersteller/ Firma
<i>Hyper Ladder 1kb</i>	BioLine
<i>LE Agarose / Plaque Agarose</i>	Biozym
<i>Ethidiumbromid-Lösung 0,025% (Art No. 2218.1)</i>	Carl ROTH
<i>Tris-Borat-EDTA-Puffer</i>	Sigma
<i>RNAse free water</i>	Qiagen
<i>Bromphenolblau</i>	Sigma-Aldrich (München)

Tabelle 11: Verwendete Chemikalien.

2.1.5. Geräte

Geräte	Hersteller/ Firma
Bio Robot EZ1 Workstation	Qiagen
Biometra TRIO (PCR-Gerät)	Analytik Jena AG
7500 Real-Time PCR System, Thermocycler (TaqMan-qPCR)	Thermo Scientific Applied Biosystems™
Universalzentrifuge HERAEUS® MEGAFUGE® 1.0 / MEGAFUGE® 16	Thermo Electron LED GmbH (Vertrieb Heraeus), Thermo Scientific
Centrifuge 5417 R / 5417C	Eppendorf® Vertrieb Deutschland GmbH
NanoDrop 2000™ Spektralphotometer, Thermofischer	Messung der DNA-Konzentration
AccuBlock (Heizblock)	Eppendorf® Vertrieb Deutschland GmbH
Thermomixer Comfort	Eppendorf® Vertrieb Deutschland GmbH
Intas Gel IX Imager (Geldokumentationsanlage)	Intas Science Imaging Instrument GmbH Göttingen
Hera Safe KS12 (Sicherheitswerkbank)	Thermo Electron LED GmbH 8Vertrieb Heraeus), Thermo Scientific
UV/White Light-Transilluminator	UVP (© Analytik Jena AG)
PowerPac™ Universal Power Supply (Gelelektrophorese)	Bio-Rad Laboratories

Tabelle 12: Verwendete Geräte im Labor des Instituts für Virologie.

2.1.6. Kits für die DNA-Extraktion/Reinigung

Kit	Hersteller	Verwendung	Referenz
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen	Extraktion der PCR-Amplifikate (VP1 und NCCR) aus dem Gel	(Qiagen)
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen	Aufreinigung der PCR-Produkten	(Qiagen, 2010)

Tabelle 13: Kits zur Aufreinigung der PCR-Amplifikate vor der Sequenzierung.

2.1.7. Datenauswertung und Software

Software	Referenz/ Internet-Seite	Ziel
ThermoFischer Scientific Tm Calculator	www.thermofisher.com/gr/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html	Schätzung des Schmelzpunkts Tm von Primern
New England Biolabs Tm Calculator	tmcalculator.neb.com/#!/main	Schätzung des Schmelzpunkts Tm von Primern
INTAS science imaging	www.intas.de/	Geldokumentation
Geneious R6 Version 6.1.8	www.geneious.com	Auswertung der DNA-Sequenzen
Pymol	(Schrödinger, 2015) https://pymol.org/2/	Darstellung der Kristallstruktur des VP1
Swiss pdb Viewer	(Guex and Peitsch, 1997) https://spdbv.vital-it.ch/	Darstellung der VP1-Kristallstruktur
HH-Pred	(Söding et al., 2005) Bioinformatics Toolkit; Max Planck Institute for Developmental Biology, Tübingen	Homologieerkennung u. strukturelle Vorhersage
Multialin	(Corpet, 1988) <u>Multiple sequence alignment</u>	Multiple DNA-Sequenzalignment
Reverse Complement	www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html	Konvertierung der DNA-Sequenz in ihr Reverse-Komplement
Mendelay Reference Management	www.mendeley.com/reference-management/reference-manager	Archivierung der Literatur

Tabelle 14: Verwendete Programme/ Softwares.

2.2. Methodik der einzelnen Arbeitsschritte

Die Messung der JCV-Viruslast und das Einfrieren der eingesandten Proben erfolgte in der Routine-Diagnostik (Kapitel 2.2.1 und 2.2.2). Die weitere Methodik der vorliegenden Arbeit beginnt mit dem Kapitel 2.2.3.

a. Transport und Aufbereitung der Proben mit anschließender Nukleinsäure-Extraktion der JCV-DNA

Der Probentransport zum Labor sollte innerhalb von 24 Stunden bei Raumtemperatur erfolgen. Die Aufarbeitung der potentiell infektiösen Proben erfolgte in dem Bereich der Diagnostik.

b. Prinzip der Aufarbeitung aller Proben in der Diagnostik

Die Proben wurden zunächst lysiert und die freigesetzte DNA hat sich unter Zugabe von chaotropen Salzen an silicabeschichtete Magnetpartikel gebunden. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe von Magnetpartikeln eluiert. Das Gerät Bio Robot EZ1-Workstation (Qiagen®) wurde für die Nukleinsäure-Extraktion jeder Art verwendet.

2.2.1.1. Aufarbeitung der Biopsien aus Hirngewebe und Lymphknoten

Verwendetes Kit, Geräte und Materialien:

- EZ1 DNA Tissue Kit (48) Cat.No.953034 (Qiagen®) laut der Anweisung des Herstellers
- Heizblock (Eppendorf® Deutschland)
- Gerät Bio Robot EZ1 Workstation (Qiagen®)
- Einmalschalen: Zellkulturschalen 60x15mm; Firma TPP
- Pinzette: rutschfest, gekrümmte Spitze; Firma Starlab
- Skalpell: disposable Scalpel, No: 11pfm, Ref:02.001.30.011; Firma Feather Safety Razor Co., LTD

Die Aufarbeitung der Biopsien erfolgte laut Standardarbeitsanweisung (SA-VI-040.03) der Diagnostik des Instituts für Virologie, Universitätsklinikum Düsseldorf entsprechend der Anweisung des Kit- und Geräte-Herstellers Qiagen®.

2.2.1.2. Aufarbeitung der EDTA-Blut-Proben

Verwendetes Kit, Gerät:

- EZ1 DNA Tissue Kit (48) Cat.No.951034 (Qiagen®) laut Anweisung des Herstellers
- Gerät Bio Robot EZ1 Workstation (Qiagen®)

Die Aufarbeitung der EDTA-Blut-Proben erfolgten laut der Standardarbeitsanweisung (SA-VI-041.02) der Diagnostik des Instituts für Virologie, Universitätsklinikum Düsseldorf entsprechend der Anweisung des Kit- und Geräte-Herstellers Qiagen®.

2.2.1.3. Aufarbeitung von Körperflüssigkeiten wie Liquor -, Serum- und Urin-Proben

Verwendetes Kit, Gerät:

- EZ1 Virus Mini-Kit (48) v2.0 Cat.No. 955134
- Gerät Bio Robot EZ1 Workstation (Qiagen®)

Die Aufarbeitung der Seren und anderer Körperflüssigkeiten erfolgten laut der Standardarbeitsanweisung (SA-VI-042.03) der Diagnostik des Instituts für Virologie, Universitätsklinikum Düsseldorf entsprechend der Anweisung des Kit- und Geräte-Herstellers Qiagen®.

2.2.2. Messung der JCV-Viruslast in der Diagnostik -mittels Multiplex Realtime-PCR

Die Proben wurden in der Diagnostik in einer ‚in house‘ TaqMan-PCR getestet und abschließend ärztlich validiert. Die extrahierte DNA der obengenannten Proben wurde bei 2-8°C im Kühlschrank bis zu einer Woche gelagert. Danach wurden die jeweiligen Extrakte bei -20°C eingefroren und archiviert. Aus den positiven JCV-Eluaten der -20°C-Probenlagerung erfolgte eine weitere Sub-Archivierung und Sammlung der JCV-DNA positiven Patientenproben mit anschließenden PCR Amplifikationen der Genregionen NCCR und VP1 nach multiplen Testungen unterschiedlicher Primer.

Mittels Gel-Elektrophorese wurden die entsprechenden Genregionen mit Hilfe von scharfem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und zur Sequenzanalyse weitergeleitet. Im

Anschluss erfolgten die Sequenzanalyse und eine anschließende Evaluation der Struktur und Funktion der VP1-Proteine mittels einer Software. Besonders komplex war die Analyse der NCCR-Region durch die dort vorhandenen zahlreichen Deletionen und Duplikationen einzelner Genbereiche im Vergleich zum Laborstamm („Archetyp“) als auch die Identifikation des Musters der Reihenfolge der Umordnungen in der NCCR.

2.2.3. Thermalprotokolle für die PCR

2.2.3.1. JC Virus VP1- und NCCR- Analyse: Optimierung der Methodik.

Am Anfang der vorliegenden Arbeit wurden herkömmliche PCR Protokolle für die DNA-Amplifikation des VP1 Gens in beiden zur Verfügung stehenden Thermocyclern (Biometra Trio GmbH, Analytik Jena AG und 7500 Real-Time PCR System, Thermo Scientific Applied Biosystems ABI) durchgeführt. Zunächst wurde eine lange Reihe von PCR-Thermalprotokollen zur Optimierung der PCR-Methode des VP1- und NCCR-Gens durchgeführt. Diese erfolgten schrittweise mit aufeinander folgenden Änderungen der PCR-Komponenten (Polymerase, Primer) und der PCR Bedingungen (qPCR und konventionelle PCR-Thermalprotokolle, T_m, Fragmentgröße des gewünschten PCR-Produktes). Da das VP1-Gen eine schwer amplifizierbare DNA-Sequenz (1065bp) (Frisque et al., 1984) und das entsprechende PCR-Produkt oftmals zu schwach oder unsauber für eine Sequenzierung ist, waren zahlreiche Versuche mit schrittweisen Änderungen aller möglichen Faktoren, nämlich der Polymerase (als Enzym oder Master Mix), der Primer, der T_m, der Annealing-Zeit und der Elongationszeit nötig.

Die ersten PCR-Versuchsserien beinhalteten SYBR-Green qPCR-Experimente (Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix, Agilent Technologies) (Agilent, 2012; Ponchel et al., 2003), die die Anpassung an ein bereits existierendes Thermalprotokoll der Diagnostik für die Quantifizierung der Viren HIV, HBV und HCV anstrebten. In der Folge sind alle erprobten PCR-Variationen (①, ②, ③, ④) aufgeführt und nach enzymatischer Annäherung eingeteilt:

① Die PCR-Komponenten und die Temperaturprofile waren wie folgt für die **SYBR-Green-qPCR** gewählt:

i. VP1-Amplifikation mit ,nested' PCR-Protokoll

• **VP1: Komponenten für ,outer'-PCR:**

Enzym/Mastermix: Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix 25µl,

Primer: VP1-For3 / VP1-Rev4 2-3µl jeweils,

Template: 5µl, **H₂O:** bis auf 50µl

• **VP1: Komponenten für ,nested'-PCR:**

Enzym/Mastermix: Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix 25µl,

Primer: VP1-For4 / VP1-Rev3 2-3µl jeweils,

Template: 5µl, **H₂O:** bis auf 50µl

ii. NCCR-Amplifikation mit ,nested' PCR-Protokoll

• **NCCR: Komponenten für ,outer'-PCR:**

Enzym/Mastermix: Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix 25µl,

Primer: NCCR1 / NCCR2 2-3µl jeweils,

Template: 5µl, **H₂O:** bis auf 50µl

• **NCCR: Komponenten für ,nested'-PCR:**

Enzym/Mastermix: Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix 25µl,

Primer: NCCR3 / NCCR4 2-3µl jeweils,

Template: 5µl, **H₂O:** bis auf 50µl

• **PCR-Thermal-Protokoll:**

1x 10min bei 95 °C,

40x 39sec bei 95 °C; 50, 60, 90sec. bei 55, 59, 65°C; 30, 39, 105sec. bei 72°C;

1x 3min bei 72°C; Pause/Kühlung bei 4 °C.

Die *Annealingzeit* variierte durch die Experimente wie folgend: 50, 60 90 Sekunden. Die *Annealing-Temperatur* wurde für beide PCR-Runden bei 50, 55, 59°C probiert. Die *Elongationszeit* wurde von 30 Sekunden auf 1 Minute und 45 Sekunden schrittweise erhöht.

iii. NCCR-Amplifikation mit ,nested' PCR-Protokoll

• NCCR: Komponenten für ,outer'-PCR:

Enzym/Mastermix: Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix 25µl,

Primer: NCCR-RG1-F/ NCCR-RG1-R 1,5µl jeweils,

Template: 1-3µl, **H₂O:** bis auf 50µl

• NCCR: Komponenten für ,nested'-PCR Zu erwartendes Amplikon 388bp:

Enzym/Mastermix: Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix 25µl,

Primer: NCCR-RG2-F/ NCCR-RG2-R 1,5µl jeweils,

Template: 1 µl, **H₂O:** bis auf 50µl

• PCR-Thermal-Protokoll:

1x 2min bei 95 °C,

35x 20sec bei 95 °C; 20sec. bei 47, 50, 55°C; 30 sec. bei 72°C;

1x 3min bei 72°C; Pause bei 4 °C.

Die T_m wurde für beide PCR-Runden bei 47, 50 und 55°C probiert. Das obengenannte qPCR-Protokoll mit den niedrigsten T_m bei 47 und 50°C erwies sich als sehr effizient für die Amplifikation der NCCR-Region und wurde für die Analyse vieler Patientenproben (vor allem bei den Proben des Patienten 21, Tabelle 7) angewendet. Die obengenannte PCR-Primer-Kombination wurden mit unterschiedlichen Enzymen und konventionellen Thermalprotokollen probiert (s. weiter unten Kapitel 2.2.3.3.).

② Ein weiterer Ansatz für die Amplifikation des VP1 war die Verwendung von unterschiedlichen Primer-Kombinationen, die **2 überlappende VP1-Endprodukte** und damit ungefähr zwei gleich große VP1-Sequenz-Hälften amplifizierten. Das war äußerst hilfreich aufgrund der oftmals nur schwer amplifizierbaren VP1-DNA-Sequenz. Alle Primer Kombinationen mit den durchgeführten Thermalprotokolle für die **SYBR-Green-qPCR** sind im Nachfolgenden aufgeführt:

• Komponenten für die PCR1 des A'-VP1-Teils:

Enzym/Mastermix: Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix 25µ

- i. **Primer-Kombination A1':** VP1-For3 / VP1-Rev1 2µl jeweils
- ii. **Primer-Kombination A2':** VP1-For3 / VP1-Rev6 1µl jeweils
- iii. **Primer-Kombination A3':** VP1-For3 / VP1-Rev8 1µl jeweils
- iv. **Primer-Kombination A4':** VP1-Fw5 / VP1-Rev6 1µl jeweils
- v. **Primer-Kombination A5':** VP1-Fw5 / VP1-Rev8 1µl jeweils
- vi. **Primer-Kombination A6':** VP1-For4 / VP1-Rev1 1µl jeweils

Template: 2-5µl, **H₂O:** bis auf 50µl

• Komponenten für die PCR2 des B'-VP1-Teils:

Enzym/Mastermix: Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix 25µ

- i. **Primer-Kombination B1':** VP1-Fw2 / VP1-Rev3 2µl jeweils
- ii. **Primer-Kombination B2':** VP1-Fw7 / VP1-Rev3 2µl jeweils
- iii. **Primer-Kombination B3':** VP1-Fw7 / VP1-Rev5 1µl jeweils
- iv. **Primer-Kombination B4':** VP1-Fw8 / VP1-Rev5 1µl jeweils

Template: 2-5µl, **H₂O:** bis auf 50µl

• PCR-Thermal-Protokoll:

1x 10min bei 95 °C,

40x 39, 40sec bei 95 °C; 50sec. bei 55°C; 90, 105sec. bei 72°C;

1x 3min bei 72°C; Pause bei 4 °C.

Die Elongationszeit wurde von 90 Sekunden auf 1 Minute und 45 Sekunden erhöht.

Die Amplifikation des VP1 mit 2 überlappenden VP1-End-Produkten A' und B' wurde nach der Austestung der besten Primer-Kombination **A'-VP1-For3/-Rev1** und **B'-VP1-Fw7/-Rev3** auch mit typischen konventionellen Thermalprotokollen probiert. In der Folge sind diese Experimente mit PWO-DNA Polymerase (SigmaAldrich, Roche)(Roche, 2013) als auch mit Herculase II Fusion DNA Polymerase (Agilent,Technologies)(Agilent Technologies Inc., 2013; Reid et al., 2011) aufgeführt.

③ Die Zusammensetzung und die Temperaturprofile der konventionellen PCR mit **PWO DNA Polymerase (SigmaAldrich, Roche)** wurden wie folgt gewählt (Roche, 2013):

i. VP1-Amplifikation mit überlappenden VP1-PCR-Produkten in einer PCR-Runde

• Komponenten für die PCR1 des A'-VP1-Teils:

Enzym/Mastermix: PWO DNA Polymerase (SigmaAldrich, Roche) 0,5µl,

Primer: VP1-For3 / VP1-Rev1 1µl jeweils

Template: 2-3µl, **H₂O:** bis auf 50µl **Puffer 10x:** 5µl, **dNTPs:** 1µl

• Komponenten für die PCR2 des B'-VP1-Teils:

Enzym/Mastermix: PWO DNA Polymerase (SigmaAldrich, Roche) 0,5µl,

Primer: VP1-Fw7 / VP1-Rev3 1µl jeweils

Template: 2-3µl, **H₂O:** bis auf 50µl **Puffer 10x:** 5µl, **dNTPs:** 1µl

ii. VP1-Amplifikation in einer PCR-Runde

Enzym/Mastermix: PWO DNA Polymerase (SigmaAldrich, Roche) 0,5µl,

Primer-Kombination: VP1-Reid-F / VP1-Reid-R 1µl

Template: 2-3µl, **H₂O:** bis auf 50µl **Puffer 10x:** 5µl, **dNTPs:** 1µl

• PCR-Thermal-Protokoll:

1x 2min bei 94 °C,

40x 15sec bei 94 °C; 30sec. bei 57°C; 45, 60sec. bei 72°C;

1x 7min bei 72°C; Pause bei 4 °C.

Die Elongationszeit wurde von 45 Sekunden auf 1 Minute erhöht.

iii. VP1-Amplifikation in einer PCR-Runde

Enzym/Mastermix: PWO DNA Polymerase (SigmaAldrich, Roche) 0,5µl,

i. **Primer-Kombination1** VP1-For3 / VP1-Rev4 1-2µl:

ii. **Primer-Kombination2** VP1-Fw5 / VP1-Rev5 1-2µl:

Template: 2-5µl, **H₂O:** bis auf 50µl **Puffer 10x:** 5µl, **dNTPs:** 1µl

iv. VP1-Amplifikation mit ,nested' PCR-Protokoll

• VP1: Komponenten für ,outer'-PCR:

Enzym/Mastermix: PWO DNA Polymerase (SigmaAldrich, Roche) 0,5µl,

Primer: VP1-For3 / VP1-Rev4 1µl jeweils,

Template: 2-5µl, **H₂O:** bis auf 50µl, **Puffer 10x:** 5µl, **dNTPs:** 1µl

• VP1: Komponenten für ‚nested‘-PCR:

Enzym/Mastermix: PWO DNA Polymerase (SigmaAldrich, Roche) 0,5µl,

Primer: VP1-For4 / VP1-Rev3 1µl jeweils,

Template: 2-5µl, **H₂O:** bis auf 50µl, **Puffer 10x:** 5µl, **dNTPs:** 1µl

iv. NCCR-Amplifikation mit ‚nested‘ PCR-Protokoll

• NCCR: Komponenten für ‚outer‘-PCR:

Enzym/Mastermix: PWO DNA Polymerase (SigmaAldrich, Roche) 0,5µl,

Primer: NCCR1 / NCCR2 1µl jeweils,

Template: 2-5µl, **H₂O:** bis auf 50µl, **Puffer 10x:** 5µl, **dNTPs:** 1µl

• NCCR: Komponenten für ‚nested‘-PCR:

Enzym/Mastermix: PWO DNA Polymerase (SigmaAldrich, Roche) 0,5µl,

Primer: NCCR3 / NCCR4 1µl jeweils,

Template: 2-5µl, **H₂O:** bis auf 50µl, **Puffer 10x:** 5µl, **dNTPs:** 1µl

• PCR-Thermal-Protokoll:

1x 10min bei 95 °C,

40x 39sec bei 95 °C; 50, 60, 90sec. bei 55, 59, 65°C; 30, 39, 105sec. bei 72°C;

1x 3min bei 72°C; Pause bei 4 °C.

Die *Annealingzeit* variierte durch die Experimente wie folgt: 50, 60, 90 Sekunden. Die *T_m* wurde für beide PCR-Runden bei 50, 55, 59°C probiert. Die *Elongationszeit* wurde von 30 Sekunden auf 1 Minute und 45 Sekunden schrittweise erhöht.

④ Die Zusammensetzung und die Temperaturprofile der konventionellen PCR mit **Herculase II Fusion DNA Polymerase -Agilent,Technologies** (Agilent Technologies Inc., 2013) wurde wie folgt gewählt:

i. VP1-Amplifikation mit überlappenden VP1-PCR-Produkten in einer PCR-Runde

• Komponenten für die PCR1 des A‘-VP1-Teils:

Enzym/Mastermix: Herculase II Fusion DNA Polymerase 1µl

Primer: VP1-For3 / VP1-Rev1 1,25-1,5 µl jeweils

Template: 3-5µl, **H₂O:** bis auf 50µl **Puffer 5x:** 10µl, **dNTPs:** 1µl

• **Komponenten für die PCR2 des B'-VP1-Teils:**

Enzym/Mastermix: Herculase II Fusion DNA Polymerase 1µl

Primer: VP1-Fw7 / VP1-Rev3 1,25-1,5 µl jeweils

Template: 3-5µl, **H₂O:** bis auf 50µl **Puffer 5x:** 10µl, **dNTPs:** 1µl

ii. VP1-Amplifikation in einer PCR-Runde

Enzym/Mastermix: Herculase II Fusion DNA Polymerase 1µl

Primer-Kombination: VP1-Reid-F / VP1-Reid-R 1,25-1,5 µl jeweils

Template: 3-5µl, **H₂O:** bis auf 50µl **Puffer 5x:** 10µl, **dNTPs:** 1µl

iii. NCCR-Amplifikation in einer PCR-Runde

Enzym/Mastermix: Herculase II Fusion DNA Polymerase 1µl

Primer-Kombination: NCCR-Reid-F / NCCR-Reid-R 1,25-1,5 µl jeweils

Template: 5µl, **H₂O:** bis auf 50µl **Puffer 5x:** 10µl, **dNTPs:** 1µl

• **PCR-Thermal-Protokoll:**

1x 2min bei 95 °C,

40x 20sec bei 95 °C; 20sec. bei 45, 47, 48°C; 33, 35, 40sec. bei 72°C;

1x 3min bei 72°C; Pause bei 4 °C.

Die Thermalprotokolle mit der Fusion-DNA-Polymerase, Herculase II wurden mit und ohne 0,5µl DMSO durchgeführt. Die T_m wurde bei 45, 47, 48°C probiert. Ideal für die VP1-Amplifikation erwies sich die T_m bei 45°C während für das NCCR-Produkt 48°C festgelegt wurde. Die Elongationszeit wurde von 33 Sekunden auf 35 Sekunden und 40 Sekunden schrittweise erhöht.

2.2.3.2. Optimierung des PCR-Thermalprotokolls unter Zusatz eines weiteren Enzyms und einer ‚nested‘-PCR-Runde

a. Optimierung der VP1-Amplifikation

Da das Gen VP1 schwer zu amplifizieren ist und die obengenannten PCR Protokolle weiter optimiert werden sollten, wurde das Projekt mit einem weiteren PCR-Protokoll, einer 2-

Schritt oder ‚nested‘-PCR fortgesetzt. Die NCCR Amplifikation wurde ebenfalls dadurch optimiert. Eine verbesserte Amplifikation wurde erreicht mit den anderen Primern (Monaco et al., 1998; Reid et al., 2011; Van Loy et al., 2015) und effizienteren Polymerasen vom Typ ‚Phusion‘, nämlich der 1. Herculase II Fusion DNA Polymerase (Agilent Technologies), 2. Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB) und 3. Phusion High-Fidelity PCR Master Mix (NEB/ThermoFischer Scientific) .

Die 2 PCR-Runden erfolgten mit der gleichen Polymerase bzw. Polymerase Master Mix, dennoch waren das Template (die Probe), die Primer als auch das Thermal Protokoll unterschiedlich. Das Amplikon der *outer*-PCR diente als direkte Matrize zum Einsatz in der zweiten ‚nested‘ PCR. Davon wurden jeweils 2-5 µl in den Ansatz der zweiten PCR übertragen und anschließend mit den nach innen im Gen versetzten Primern amplifiziert.

1. Das ‚nested‘ PCR-Protokoll mit Herculase II Fusion DNA Polymerase (Agilent Technologies):

1. ‚Outer‘ VP1-PCR			2. ‚Nested‘ VP1-PCR		
Ansatz-Volumen 50µl			Ansatz-Volumen 50µl		
Komponente	Konzentration im Stock	Volumen [µl]	Komponente	Konzentration im Stock	Volumen [µl]
<u>Herculase II</u>		1	<u>Herculase II</u>		0,5-1
dNTPs	10 mM	1	dNTPs	10 mM	1
HF Puffer	5x	10	HF Puffer	5x	10
VP1-Reid-F	10 µM	2,5	VP1-TVL-F1	10 µM	2,5
VP1-Reid-R	10 µM	2,5	VP1-TVL-R1	10 µM	2,5
Probe		5	Probe		5
ddH ₂ O		28	ddH ₂ O		28-28,5

Tabelle 15: Die (*outer*) erste und die zweite (*nested*) PCR JCV-VP1. Die Zusammensetzung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers der Herculase II Fusion DNA Polymerase. Die Angaben entsprechen einem PCR-Ansatz von 50 µl. Es wurden für die *outer*-PCR die Primer F-Reid und R-Reid und für die ‚nested‘ PCR die Primer F1-TVL und R1-TVL eingesetzt. **HR-Puffer:** Herculase II Reaction buffer.

Die Temperaturprofile der PCR-Protokolle wurden wie folgt festgelegt:

• **VP1 ,Outer‘ VP1-PCR mit Herkulase II Fusion DNA Polymerase (Agilent Technologies)**

1x 30sec bei 98 °C,
 40x 10sec bei 98 °C; 30sec. bei 57°C; 60sec. bei 72°C;
 1x 5min bei 72°C; Pause bei 4 °C.

• **VP1 ,nested‘ VP1-PCR mit Herkulase II Fusion DNA Polymerase (Agilent Technologies)**

1x 30sec bei 98 °C,
 40x 10sec auf 98 °C; 30sec. bei 64°C; 60sec. bei 72°C;
 1x 5min bei 72°C; Pause bei 4 °C.

2. Das „nested“ PCR-Protokoll mit Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB):

1. ,Outer‘ VP1-PCR			2. ,Nested‘ VP1-PCR		
Ansatz-Volumen 50µl			Ansatz-Volumen 50µl		
Komponente	Konzentration im Stock	Volumen [µl]	Komponente	Konzentration im Stock	Volumen [µl]
<u>Phusion HF</u>		0,5	<u>Phusion HF</u>		0,5-1
dNTPs	10 mM	1	dNTPs	10 mM	1
HF Puffer	5x	10	HF Puffer	5x	10
VP1-Reid-F	10 µM	2,5	VP1-TVL-F1	10 µM	2,5
VP1-Reid-R	10 µM	2,5	VP1-TVL-R1	10 µM	2,5
Probe		5	Probe		5
ddH ₂ O		28,5	ddH ₂ O		28-28,5

Tabelle 16: Die (*outer*) erste und die zweite (*nested*) PCR JCV-VP1. Die Zusammensetzung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers der Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase. Die Angaben entsprechen einem PCR-Ansatz von 50 µl. Es wurden für die outer-PCR die Primer F-Reid und R-Reid und für die ,nested‘ PCR die Primer F1-TVL und R1-TVL eingesetzt. **Phusion HF:** Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase **HF Puffer:** Phusion HF Buffer

Die Temperaturprofile der PCR-Protokolle wurden wie folgt festgelegt:

• ***„Outer“* VP1-PCR mit Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB)**

1x 30sec bei 98 °C,
40x 10sec bei 98 °C; 30sec. bei 57°C; 60sec. bei 72°C;
1x 5min bei 72°C; Pause bei 4 °C.

Die Annealingzeit und die T_m variierten durch die Experiment-Serie wie folgt: 20“ bei 54°C, 30“ bei 57°C, 30“ bei 58°C und 20“ bei 60°C. Die Elongationszeit wurde von 1 Minute auf 30 Sekunden schrittweise reduziert.

• ***„nested“* VP1-PCR mit Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB)**

1x 30sec bei 98 °C,
40x 10sec bei 98 °C; 30sec. bei 64°C; 60sec. bei 72°C;
1x 5min bei 72°C; Pause bei 4 °C.

Die Elongationszeit wurde von 1 Minute auf 30 Sekunden schrittweise reduziert.

Das Enzym Herculase II Fusion DNA Polymerase (Agilent Technologies) wurde in denselben PCR-Experimenten und jeweils in demselben Gerät inklusive Templates und Thermalprotokoll parallel zu 1. der Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB) und 2. Phusion High-Fidelity PCR Master Mix (NEB) (s. weiter unten Kapitel 2.2.3.3.) getestet und verglichen. Der Phusion High-Fidelity PCR Master Mix (NEB) erwies sich als die optimalste, einfachste und stärkste enzymatische Komponente für die Amplifikation des VP1-Genes mit den bereits ausgewählten Primern.

Das optimale JCV-VP1-Amplifikat wurde erzielt mit dem Enzym Phusion Polymerase im Mastermix (NEB/ Thermofischer Scientific). Die *„nested“*-PCR des JCV-VP1 wurde ebenfalls mit der Phusion High Fidelity Polymerase Master Mix durchgeführt. Beide Thermalprotokolle werden weiter unten in Tabelle 17 und 18 dargestellt.

3. Das „nested“ PCR-Protokoll mit Phusion High-Fidelity PCR Master Mix (NEB/ThermoFischer Scientific):

1. ‚Outer‘ VP1-PCR		2. ‚Nested‘ VP1-PCR			
Ansatz-Volumen 50µl		Ansatz-Volumen 50µl			
Komponente	Konzentration im Stock	Volumen [µl]	Komponente	Konzentration im Stock	Volumen [µl]
Phusion MM	2fach	25	Phusion MM	2fach	25
VP1-Reid-F	10 µM	2,5	VP1-TVL-F1	10 µM	2,5
VP1-Reid-R	10 µM	2,5	VP1-TVL-R1	10 µM	2,5
Probe		5	Probe		2
ddH ₂ O		15	ddH ₂ O		18

Tabelle 17: Die (*outer*) erste und die zweite (*nested*) PCR JCV-VP1. Die Zusammensetzung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers des Phusion High-Fidelity PCR Master Mix. Die Angaben entsprechen einem PCR-Ansatz von 50 µl. Es wurden für die *outer*-PCR die Primer F-Reid und R-Reid und für die ‚nested‘ PCR die Primer F1-TVL und R1-TVL eingesetzt. **Phusion MM:** Phusion High-Fidelity PCR Master Mix.

PCR-Thermal-Protokoll		‚Outer‘ VP1-PCR		‚Nested‘ VP1-PCR	
		Fragmentgröße 1316bp		Fragmentgröße 1201bp	
Schritt	Zyklenzahl	Temperatur [°C]	Zeit	Temperatur [°C]	Zeit
Vorheizen	1x	98	30 sec	98	30 sec
Denaturierung	35x	98	10 sec	98	10 sec
Annealing		60	20 sec	65	30 sec
Elongation		72	37 sec	72	30 sec
Finale Elongation	1x	72	5 min	72	5 min
Abkühlen		4	∞	4	∞

Tabelle 18: Thermalprotokoll für die Amplifizierung des VP1 des JCV. Das Protokoll gilt für die erste (*outer*) und zweite (*nested*) PCR mit Phusion High-Fidelity PCR Master Mix. Die *Annealing*-Temperatur (T_m) wurde auf 60 °C für die erste und auf 65 °C für die zweite PCR festgelegt.

Die Elongationszeit der 1.,*outer*' PCR wurde schrittweise von 30 auf 37 Sekunden erhöht und die Annealingzeit von 30 auf 20 Sekunden reduziert. Dadurch wurde ein besseres PCR-Produkt erhalten. Die *Annealing*-Temperatur (T_m) wurde bei der ersten VP1-PCR-Runde für das Phusion High-Fidelity PCR Master Mix steigend (57-61°C) in multiplen PCR-Experimenten getestet. Die ideale T_m für das gewünschte VP1-Amplifikat wurde auf 60°C festgelegt. Gleichfalls wurden unterschiedliche T_m (64, 65, 66°C) bei den Optimierungsexperimenten der zweiten ,*nested*'-PCR-Runde probiert. Das optimale VP1-Amplifikat war bei 65 °C zu erreichen (s. Tabelle 18).

Die gleiche PCR-Parameter, nämlich der enzymatische Mastermix, alle Thermalprotokolle, die unterschiedlichen T_m und Elongationszeiten als auch die Zusammensetzung der PCR-Komponenten bis auf der ,*anti-sense*' bzw. Reverse-Primer der 2.'*nested*' PCR-Runde VP1-TVL-R1 wurden auch mit dem Reverse-Primer VP1-TVL-R2 durchgeführt mit einem erwartetem Amplifikat bei 884bp. Das Ergebnis dieser Versuchsserie war nicht ideal.

b. Optimierung der NCCR-Amplifikation

Die Optimierung der NCCR-Amplifikation erfolgte mit dem Phusion enzymatischen MasterMix (NEB/ThermoFischer Scientific):

1. ,<i>Outer</i>' NCCR-PCR			2. ,<i>Nested</i>' NCCR-PCR		
Ansatz-Volumen 50 µl			Ansatz-Volumen 50 µl		
Komponente	Konzentration im Stock	Volumen [µl]	Komponente	Konzentration im Stock	Volumen [µl]
<u>Phusion MM</u>	2fach	25	<u>Phusion MM</u>	2fach	25
NCCR RG1-F	10 µM	2,5	NCCR RG2-F	10 µM	2,5
NCCR RG1-R	10 µM	2,5	NCCR RG2-R	10 µM	2,5
Probe		5	Probe		2
ddH ₂ O		15	ddH ₂ O		18

Tabelle 19: Die (*outer*) erste und die zweite (*nested*) PCR JCV-NCCR. Die Zusammensetzung laut den Angaben des Herstellers des Phusion High-Fidelity PCR Master Mix. Die Angaben entsprechen einem PCR-Ansatz von 50 µl. Es wurden für die *outer*-PCR die Primer NCCR RG1-F und NCCR RG1-R und für die ,*nested*' PCR die Primer NCCR RG2-F und NCCR RG2-R eingesetzt. **Phusion MM:** Phusion High-Fidelity PCR Master Mix.

PCR-Thermal-Protokoll		„Outer“ NCCR-PCR Fragmentgröße 1316bp		„Nested“ NCCR-PCR Fragmentgröße 388bp	
Schritt	Zyklenzahl	Temperatur [°C]	Zeit	Temperatur [°C]	Zeit
Vorheizen	1x	98	30 sec	98	30 sec
Denaturierung	35x	98	10 sec	98	10 sec
Annealing		60	30 sec	62	30 sec
Elongation		72	30 sec	72	30 sec
Finale Elongation	1x	72	5 min	72	5 min
Abkühlen		4	∞	4	∞

Tabelle 20: Thermalprotokoll für die Amplifizierung der NCCR-Genegion des JCV-Genoms. Das Protokoll gilt für die erste (*outer*) und zweite (*nested*) PCR mit Phusion High-Fidelity PCR Master Mix. Die *Annealing*-Temperatur (T_m) wurde auf 60 °C für die erste und auf 62 °C für die zweite PCR festgelegt.

Zur Experiment-Optimierung wurde die *Annealing*-Temperatur (T_m) bei der ersten (*outer*) NCCR-PCR-Runde für das Phusion High-Fidelity PCR Master Mix und der jeweiligen Zusammensetzung steigend (59-61°C) in multiplen PCR-Experimenten variiert. Die ideale T_m für das gewünschte NCCR-Amplifikat wurde auf 60°C festgelegt. Gleichfalls wurden unterschiedliche T_m für die zweite *nested* Runde bei 60, 62, 63°C getestet. Das optimale NCCR-Amplifikat war bei 62 °C nachweisbar (s. Tabelle 20).

2.2.4. Aufreinigung der PCR-Produkte

2.2.4.1. Die Visualisierung und die Auftrennung der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese

Zunächst diente die Gelelektrophorese zur Optimierung der besten VP1- und NCCR- PCR-Protokolle und weiterhin zu der qualitativen und quantitativen Analyse der VP1- und NCCR-PCR-Produkte. Nach dem Zusatz von 6fach konzentriertem TBE-Probenpuffer (10 % (v/v) Glycerin, 6x TBE-Puffer, und Bromphenolblau) wurden die PCR-Produkte in Ethidiumbromid- haltigem 1,2% *low-melt* Agarose-Gel in 1x TBE-Puffer aufgetragen (TBE-Puffer, 10x von Sigma Aldrich, mit 1x Millipore-Wasser verdünnt). Die Laufbedingung der

Elektrophorese schloss eine Auftrennung bei 100 V für 40 min (ggf. bei 130 V für 65min für schnellere Läufe) in der Gelelektrophoresekammer nach der Gel-Präparation und der über Nacht-Lagerung bei +4°C des Gels (AppliChem, 2009) ein.

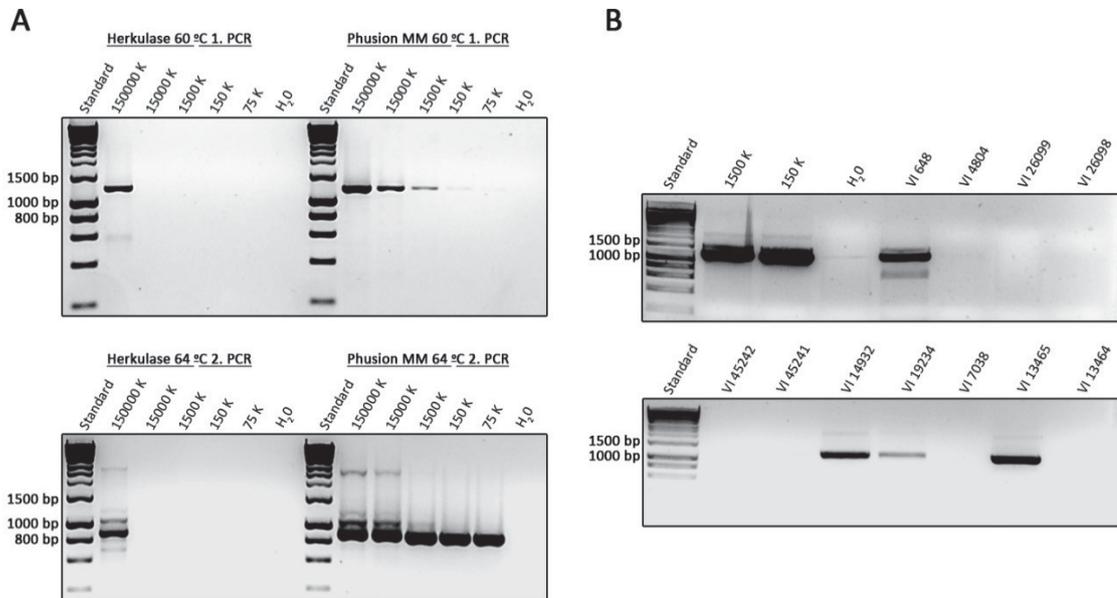


Abb. 14: Dargestellt sind insgesamt vier 1,2 %-ige *low-melt* Agarosegele mit Ethidiumbromid als Farbstoff und identischen Laufbedingungen bei 100 V für 40 min. **A:** Auf der linken Seite ist der Vergleich von 2 Polymerasen des Typs ‚Fusion‘ (Herkulase und Phusion MM) für die ‚outer‘ VP1-PCR bei 60°C (1.Gel, oben) und die ‚nested‘ VP1-PCR bei 65°C (2.Gel, unten) zu sehen. Aufgetragen wurden je 10 µl des Standards und 10 µl der Proben. Das Amplifikat der ersten PCR mit den Primern VP1-F-Reid und VP1-R-Reid, (oben) ist 1316 bp und das der ‚nested‘ PCR (unten) mit den Primern VP1-TVL-F1 und VP1-TVL-R2 884 bp groß. **B:** Auf der rechten Seite sind 2 Gele mit den Standards, den positiven Kontrollen mit 1500 K/ml und 150 K/ml des JCV-Plasmides, negativen Kontrolle (H₂O) und den Patientenproben (VI-Bezeichnung) zu sehen. Aufgetragen wurden je 8 µl des Standards und 30 µl der Proben, die in einer ersten und anschließend in einer zweiten ‚nested‘ PCR-Runde für das JCV-VP1 amplifiziert wurden. In der zweiten PCR wurden die Primer VP1-TVL-F1 und VP1-TVL-R1 verwendet. Das erzielte Amplifikat ist 1201 bp groß. Die 4 positiven Banden wurden mittels Gel Extraktion (Qiagen®, QIAquick Gel Extraction Kit) aufgereinigt und sequenziert.

In der Folge erfolgte die Visualisierung der DNA-Banden mit Hilfe des darin interkalierten Ethidiumbromids und der 1kb Hyperladder als Größenmarker auf dem UV-Transilluminator (s. Abb. 14).

2.2.4.2. Gelextraktion von DNA Fragmenten

Die DNA-Mischung von PCR-spezifischen aber auch unspezifischen Fragmenten wurde nach der elektrophoretischen Auftrennung mit dem 1kb Hyperladder als Größenmarker in einem

UV-Transilluminator verglichen. Die gewünschten VP1- und NCCR-Banden wurden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und entnommen. Weiterhin wurden sie entsprechend dem Herstellerprotokoll von Qiagen®, QIAquick Gel Extraction Kit eluiert. Das Prinzip der Methode beruht auf der Adsorption der Nukleinsäure an eine Silikamatrix (Säule).

2.2.5. Konzentrationsmessung der NCCR- und VP1- PCR-Produkte

Nach der DNA-Gelextraktion wurde die Konzentration der gereinigten PCR-Produkte mittels des Spektralphotometers NanoDrop (ThermoFischer) gemessen. Bei einer ausreichenden Konzentration von mindestens 5 ng/μL für die NCCR-Region und 10 ng/μL für die VP1-Gen-Region laut der Anweisung der Firma Eurofins Genomics (Eurofins, 2018) konnten die gereinigten PCR-Produkte zur Sequenzierung zur Firma Eurofins Genomics versandt werden.

2.2.6. Analyse der VP1-Mutationen

Die Analyse der VP1-Mutationen erfolgte mit Verwendung des universellen genetischen Codes (s. Tabelle 21)

2.2.7. DNA-Sequenzierung

Die Proben wurden anschließend gemäß dem „Sample Submission Guide“ von Eurofins (Eurofins, 2018) für die Sequenzierung vorbereitet.

2.2.8. JCV-VP1 Struktur-Vorhersage und Modellierung

Das Protein des VP1-Prototyps (J02226) wurde mit dem Strukturvorhersage-Softwaretool HH-Pred (Bioinformatik-Toolkit des Max-Planck-Instituts für Entwicklungsbiologie, Tübingen, Deutschland) analysiert und mit 100%iger Wahrscheinlichkeit (*E-value*: 1e-155) als ähnlich mit der Kristallstruktur des Simian Virus 40 VP1 (1SVA (Stehle et al., 1996); <https://www.rcsb.org/structure/1SVA>) identifiziert. Basierend auf dieser 1SVA-Kristallstruktur, aber auch auf der JCV VP1pentamer Struktur in Komplex mit LSTc [(Neu et

al., 2010b), 3NXG; <https://www.rcsb.org/structure/3NXG>], wurde in HH-Pred ein Modell des JCV-VP1-Proteins erstellt und mit Swiss-PDB-viewer Software aufgezeichnet und dokumentiert (Guex and Peitsch, 1997; Söding et al., 2005) (<https://spdbv.vital-it.ch/>).

		Zweite Base									
		U		C		A		G			
Erste Base	U	UUU	Phenylalanin Phe (F)	UCU	Serin Ser (S)	UAU	Tyrosin Tyr (Y)	UGU	Cystein Cys (C)	U	Dritte Base
		UUC		UCC		UAC		UGC		C	
		UUA	Leucin Leu (L)	UCA		STOP	UGA	STOP	A		
		UUG		UCG	UAG		UGG	Tryptophan Trp (W)	G		
		CUU		CCU CCC CCA CCG	Prolin Pro (P)	CAU	Histidin His (H)	CGU	Arginin Arg (R)	U	
		CUC				CAC		CGC		C	
	CUA	CAA	Glutamin Gln (Q)			CGA	A				
	CUG	CAG				CGG	G				
	A	AUU	Isoleucin Ile (I)	ACU ACC	Threonin Thr (T)	AAU	Asparagin Asn (N)	AGU	Serin Ser (S)	U	
		AUC				AAC		AGC		C	
		AUA				AAA	Lysin Lys (K)	AGA	Arginin Arg (R)	A	
	AUG	AAG	AGG	G							
G	GUU	Valin Val (V)	GCU	Alanin Ala (A)		GAU	Asparaginsäure Asp (D)	GGU	Glycin Gly (G)	U	
	GUC		GCC			GAC		GGC		C	
	GUA		GCA		Glutaminsäure Glu (E)	GGA	A				
	GUG		GCG			GAG	GGG	G			

Tabelle 21: Die 20 kanonischen Standardamino­säuren, die durch *Codons* (Basentriplets) des menschlichen genetischen Materials kodiert werden. Anhand der AS-Abkürzungen werden weiter unten die nachgewiesenen Mutationen der Aminosäurestellen aufgeführt. **G:** Guanin, **A:** Adenin, **C:** Cystein, **T:** Thymin **STOP:** Die Basentriplets, die bei der Translation zu einem Stop, nämlich zum Beenden der Proteinsynthese führen.

3. Ergebnisse

3.1. Die molekulare JCV-DNA Analyse im PML-Patienten-Kollektiv

3.1.1. Optimierung des PCR-Thermalprotokolls

Nach multiplen PCR-Austestungen wurden die optimalen PCR-Thermalprotokollen für die molekulare Analyse der Patienten-Proben festgelegt. Die optimale Sequenzanalyse erfolgte für das VP1 und die NCCR mit jeweils 2 unterschiedlichen Thermalprotokollen, wie sie auch im Kapitel 2 aufgeführt sind (s. Kapitel 2.1.2.1 und 2.2.3.). Kurz gefasst sind es die Folgenden:

1. VP1-Amplifikation:

- a. ‚*nested*‘ PCR-Protokoll mit den Primer-Paaren: VP1-Reid-F/VP1-Reid-R (‚*outer*‘ PCR) und VP1-TVL-F1/VP1-TVL-R1 (‚*inner nested*‘ PCR) und dem Phusion High Fidelity Mastermix (NEB/ThermoFischer Scientific) (Reid et al., 2011; Van Loy et al., 2015) als Enzym und
- b. mit PCR-Protokollen, die durch eine ‚*Real-Time*‘ SYBR-Green QPCR (Brilliant II Mastermix) zwei überlappende VP1-Produkte erzeugen. Die Primer für jeden VP1-Teil sind für das A‘-VP1-Teil: VP1-For3/ VP1-Rev1 und das B‘-VP1-Teil: VP1-Fw7/ VP1-Rev3.

2. NCCR-Amplifikation:

- a. mit einer ‚*nested*‘ PCR-Protokoll mit den Primer-Paaren: NCCR-RG1-F/NCCR-RG1-R (‚*outer*‘ PCR) und NCCR-RG2-F/NCCR-RG2-R (‚*inner nested*‘ PCR), sowohl mit dem Phusion High Fidelity Mastermix (NEB/ThermoFischer Scientific) als Enzym,
- b. als semiquantitative ‚*Real-Time*‘-SYBR-Green QPCR (Brilliant II Mastermix) (Monaco et al., 1998).

Die Sequenzanalyse und die Charakterisierung der jeweiligen AS-Mutationen der VP1-Sequenzen erfolgte nach dem Vergleich mit dem JCV Mad-1 Genom aus der Genbank mit der Eintragsnummer J02226.1/NCBI-,*Reference-Sequence*‘: NC_001699.1 und laut dem genetischen Code (s. Tabelle 21) während die NCCR-Sequenzen von Patienten mit dem NCCR-Archetyp verglichen wurden (Frisque et al., 1984; NCBI, 2000).

3.1.2. Die Bearbeitung und die Auswertung der Sequenzen

Jede VP1-Sequenz wurde anhand des genetischen Codes mit Hilfe der Software Geneious R6 Version 6.1.8. analysiert und ausgewertet. Die vorliegenden Mutationen bei den Aminosäuren wurden anhand ihrer Symbole (s. Tabelle 21) und ihrer Position im VP1-Protein beschrieben (s. Tabelle 22) .

Mit Hilfe der Software Geneious R6 Version 6.1.8. und ‚Multialin-Internet-tool‘ (Corpet, 1988) wurden weiterhin die NCCR-Sequenzen, nämlich die vorliegenden Duplikationen, Insertionen und Deletionen jeder Probe in Bezug auf den Archetyp (s. Tabelle 23) (Hansjürgen T. Agostini et al., 1997; Ault, 1997; Gosert et al., 2010; Yogo et al., 1990) ausgewertet.

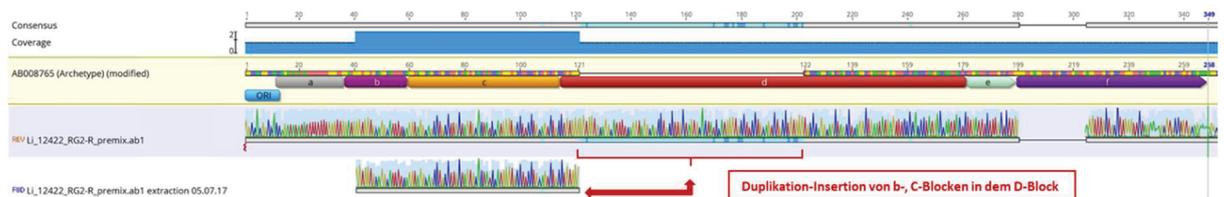


Abb. 15: Darstellung des Alignments von dem Sequenzierungs-Chromatogramm der Probe-Nr.13/Patient-Nr.2 (in der Mitte als ‚Li_12422_RG2_premix_ab1‘ bezeichnet) zusammen mit der daraus extrahierten Duplikation und Insertion von bend- und C- Sequenzblöcken (unten mit rotem Pfeil markiert) bei der Analyse mit der Geneious R6 Version 6.1.8 Software. Die Sequenz des Archetyps findet sich bei dem Alignment (oben als ‚B008765 Archetype-modified‘ bezeichnet) als den mit a-b-c-d-e-f-markierten Sequenzblöcken. Wie weiter unten im Text erläutert wird die NCCR-Sequenz anhand ihrer Länge und der archetypischen Nummerierung wie folgt ‚übersetzt‘:

ORI - A - B - C - dstart - INS_d_74bp(122-195)_[(bend - C)_(41-114)] - d - E - Δ_f_24bp(200-223)

Die Sequenzierung als auch die Auswertung der NCCR Sequenzen wird in der Folge, wie in Abb. 15 erläutert, dargestellt. Als Beispiel wird das Alignment von dem Sequenzierungs-Chromatogramm der Probe-Nr.13 beim Patient-Nr.2 (in der Mitte der Abb. 15, als ‚Li_12422_RG2_premix_ab1‘ bezeichnet) zusammen mit der daraus extrahierten Duplikation-Insertion von b- und C- Sequenzblöcken dargestellt (unterhalb des Chromatogramms bei der Abb. 15 mit rotem Pfeil markiert). Die Sequenz des Archetyps ist bei dem Alignment (oben als ‚B008765 Archetype-modified‘ bezeichnet) mit den a-b-c-d-e-f-markierten Sequenzblöcken eindeutig durch unterschiedliche Farben dargestellt. Ein Teil des NCCR-Chromatogramms auf der Abb. 15 ist mit hellem Blau unterstrichen. Der gleiche

Bereich beim Archetyp (färbige Sequenzblöcken) wird nun unterbrochen. Beim ‚Ausschneiden‘ des bestimmten Sequenzteils im Geneious („*Extraction*“ mit Roten Spitzklammern markiert) und erneutem „*Alignment*“ wird die Abstammung der extrahierten Sequenz identifiziert. Die Sequenz entstammt zum Teil dem b-Block (kleingeschrieben) und dem C-Block. Nach seiner Duplikation wurde dieser NCCR-Teil als Insertion in dem Sequenz-Block d inkorporiert. Konkreter wie es auch auf die Tabelle 23 aufgeführt wird:

ORI - A - B - C - d_{start} - INS_d_74bp(122-195)_{[(b_{end} - C)_{(41-114)]} - d - E - Δ_f_24bp(200-223)}

Wichtig bei der Beschreibung jeder NCCR-Sequenz (s. Tabelle 23) in dieser Arbeit ist die Nukleotidbasen-Nummerierung der vorliegenden amplifizierten Virus-Sequenz in Grün. Die Nukleotidbasen, die der Nummerierung im Archetyp entsprechen, werden in Schwarz (bzw. fett Blau in der Tabelle 23) dargestellt. Die nicht unterbrochenen archetypischen Sequenzblöcke wurden hierbei mit großen Buchstaben geschrieben, während die abgeschnittenen/veränderten Sequenzblöcke mit Kleinbuchstaben dargestellt wurden. Bei dem benannten Beispiel folgen die Sequenzblöcke: A-B-C der ORI-Sequenz ohne Unterbrechung ihrer archetypischen Reihenfolge. Weiter hinten wird der d-Block unterbrochen: es wird anstelle der 74 Nukleotidbasen des d-Blocks (122-195 bp der Sequenz-Nummerierung der aktuellen -längeren verglichen zum Archetyp- Sequenz des Patienten-Virusstammes in Grün) ein duplizierter Teil ab Ende des b-Blocks und der ganze C-Block, nämlich das archetypische NCCR-Teil: 41-114 bp (Nummerierung des Archetyps in Schwarz) als Insertion integriert. Nach der benannten Insertion folgt das Ende des unterbrochenen d-Blocks, der E-Block und der f-Block, der zusammen mit einer typischen 24-bp-Deletion auftaucht. Bei der 24bp-Deletion des f-Blocks sind die archetypischen Nukleotidbasen 200-223 deletiert bzw. ausgeschnitten. Im Anschluss werden die jeweiligen sequenzierten Proben im Bereich des VP1-Gens und der NCCR Region charakterisiert.

Die entsprechende detaillierte Nummerierung und die Lokalisierung der VP1-AS-Substitutionen bzw. der Umordnungen der NCCR -Region sind in den Tabellen 23 und 24 dokumentiert als auch in der Abbildung 16 schematisch abgebildet. In der Folge sind die Hauptgenveränderungen der JCV-Sequenz beim VP1 und NCCR bei jedem Patienten detailliert aufgeführt:

Der Patient Nr. 1. weist in allen untersuchten Liquor-Proben die VP1-AS-Substitution R75K auf. In der ersten Liquorprobe wurde eine JC-Viruslast bei 17.158.322 K/ml nachgewiesen. Diese Probe zeigt gegenüber späteren Proben zusätzliche VP1-AS-Substitutionen: T4Q; S296C als auch viele stillen Mutationen. Mit dem Absinken der JC-Viruslast in einem Zeitraum von sechs Monaten verringerte sich schrittweise die Anzahl der nachgewiesenen VP1-AS-Substitutionen auf zwei (R75K; S296C) bei 55.700 K/ml und anschließend auf die R75K-Mutation bei 2.062 K/ml. Bis zum Ende der Untersuchungsperiode wies der Patient das gleiche NCCR-Muster bei allen Liquor- und Serum-Proben auf. Die NCCR Region des Patienten zeigt eine Deletion von 84bp des c-Blocks, eine weitere Deletion von 19bp des f-Blocks und eine Insertion von 71bp im c-Block. Diese Insertion enthält NCCR-Teile in der Reihenfolge wie auch auf der Tabelle 23 aufgeführt: das Ende des d-Blocks, das ganze E-, B- und die erste Hälfte des c-Blocks.

Der Patient Nr.2 weist in zwei untersuchten Liquor-Proben innerhalb desselben Monats die VP1-AS-Substitutionen R75K und N265H auf. Bei der ersten Liquor-Probe fand sich eine Viruslast von 1.370.000K/ml mit einer Mischung von zwei Mutationen bei der AS-Position 265, nämlich die Substitutionen N265H und N265Q. Als die Viruslast während eines Monats auf 92.000K/ml gesunken war, waren nur die AS-Substitutionen R75K und N265H nachzuweisen. Über die ganze Untersuchungszeit der Proben (1,5 Monate) wies der Patient ein unverändertes NCCR-Muster auf. Dies beinhaltet eine der 2 typischen f-Block-Deletionen von 24bp und eine Insertion in dem d-Block von den duplizierten NCCR-Teilen in der Reihenfolge der letzten drei Viertel des b-Blocks gefolgt von unverändertem C-Block.

Der Patient Nr.3 weist beim VP1 ein interessantes AS-Substitutionsmuster innerhalb von 4 Monaten auf. Das erste Paar von Proben zeichnet sich durch eine niedrige JC-Viruslast (64 K/ml im Liquor und 7.020 K/ml im Serum) und die archetypische Sequenz beim Liquor (wt = *Wild Type*) aus.

Patient	Probe	Material (vl)	Mutationen - AS-Substitutionen	Viruslast (iU/ml)	Eingang	Diagnose
1	1	Liquor (4803)	R75K S269C*	55700	2015-01-30	V.a.PML
	3	Liquor (648)	T4Q R75K S296C Stille Mutationen: 264; 281	17158322	2015-01-06	
	8	Liquor (26098)	R75K	2062	2015-06-12	
2	11	Liquor (19234)	R75K N265H/Q	1370000	2015-04-28	Z.n. Rituximab-Therapie
	17	Liquor (14932)	R75K N265H	924000	2015-04-01	
3	18	Liquor (7038)	wt*	64	2015-02-13	V.a.PML
	19	Serum (13465)	R75K S117T T128A L158V N265D/wt K345R	7020	2015-03-13	
23	23	Liquor (25819)	K60N R75K S117T T128A Q155R L158V K345R	734484	2015-06-11	PML - MS unter Tysabri seit 2006
	24	Serum (25820)	K60N R75K S117T T128A L158V K345R	53104	2015-06-11	
4	25	Serum (49062)	V27F wt/R75K	45	2015-11-02	V.a.PML
	30	Liquor (23879)	A2G R75K S117T T128A L158V F251L S269F K345R	4980	2015-05-28	
5	31	Serum (20906)	R75K/wt S117T T128A L158V S269Y K345R	880	2015-05-09	V.a.PML
	32	Serum (30206)	R75K S117T T128A L158V S269Y	68110	2015-07-08	
6	34	Liquor (19961)	N74S R75K T128A L158V S269F K345R	304455	2015-05-04	PML - MS unter Tysabri seit 2006
	36	Liquor (19856)	N74S R75K T128A L158V S269F	298920	2015-05-04	
7	38	Serum (26921)	N74S R75K T128A L158V S269F K345R	229	2015-06-17	Z.n. Rituximab-Therapie
	42	Serum (35357)	R75K S269F E322K/wt	4865	2015-08-07	
8	43	Liquor (35340)	R75K wt/S267F; Mischpopulation mit wt* (2xS)**	508400	2015-08-07	V.a.PML
	44	Liquor (40546)	R75K S117T T128A L158V N265S K345R	2130	2015-09-09	
9	48	Serum (11106)	N74S R75K S117T T128A L158V S267F K345R	33000	2015-03-10	V.a.PML bei Nataliyumab-Therapie
	52	Liquor (47355)	R75K F263Y S269Y	13841	2015-10-22	
10	54	Liquor (42782)	R75K F263Y S269Y	20760	2015-09-23	PML, MS seit 1994
	57	Liquor (35)	wt*	77	2015-01-02	
11	61	Liquor (11568)	K60N R75K S117T T128A L158V K345R	390	2015-03-12	NHL - Z.n. RituximabTherapie
	62	EDTA-Blut (11569)	N74S R75K T128A L158V K345R	2460	2015-03-12	
12	63	Liquor (52858)	T4Q L55F/wt N74S R75K T128A L158V	1835	2015-11-26	HIV-assoziierte PML
	67	Serum (14052)	R75K S269Y	1440	2015-03-26	
13	68	Liquor (14051)	D66H N74S R75K T128A L158V K345R	4140	2015-03-26	V.a.PML
	69	Serum (6802)	K60N R75K S117T T128A L158V K345R; viele stille Mutationen	1050	2016-02-10	
14	70	Hirnbiopsie (8175)	R75K S117T T128A L158V K345R	351000000	2016-02-15	V.a.PML
	71	Liquor (41876)	L55F	76950	2016-09-09	
15	74	Serum (12573)	R75K L158V S269Y	46653	2016-03-14	V.a.PML
	76	Liquor (29276)	R75K L158V N265D K345R	10979275	2015-07-02	
16	79	Liquor (50629)	R75K	12165	unbekannt	V.a.PML
	83	Liquor (46538)	E69D N74S R75K S117T T128A L158V K345R	4920	2012-12-11	
17	84	Liquor (14122)	E69D N74S R75K S117T T128A L158V K345R E322K/E S307P	1189478	2013-03-27	Hyper-IgE Syndrom, JCV-Proliferation ohne PML
	85	Liquor (7878)	E69D N74S R75K S117T T128A L158V K345R	698010	2013-02-19	
18	86	Liquor (21758)	E69D N74S R75K S117T T128A L158V K345R	584000	2013-05-15	V.a.PML
	89	EDTA-Blut (9135)	E69D N74S R75K S117T T128A L158V K345R R285K/R	88680	2013-02-26	
19	91	EDTA-Blut (17023)	E69D N74S R75K S117T - L158V K345R R285K/R	5000000	2013-04-15	V.a.PML
	93	EDTA-Blut (25642)	E69D N74S R75K S117T T128A L158V K345R	2377800	2013-06-11	
20	94	Urin (46098)	E69D N74S R75K S117T T128A L158V K345R R285K/R	511200000	2012-11-06	V.a.PML
	95	Urin (693)	E69D N74S R75K S117T T128A - K345R	1130000000	2013-01-07	
21	96	Urin (3052)	E69D N74S R75K S117T T128A L158V K345R	156300000	2013-01-21	V.a.PML
	97	Urin (5810)	E69D N74S R75K S117T T128A L158V K345R L201/F	76800000	2013-02-06	
22	98	Urin (7280)	E69D N74S R75K S117T T128A L158V K345R	642000000	2013-02-15	V.a.PML
	99	Urin (14076)	E69D N74S R75K S117T T128A L158V K345R	85800000	2013-03-27	
23	100	Urin (21663)	E69D N74S R75K S117T T128A L158V K345R E322K/E S307P	1788000000	2013-05-14	V.a.PML
	101	Urin (32615)	E69D N74S R75K S117T T128A L158V K345R	75780	2013-07-29	

Tabelle 22: Darstellung der Sequenzanalyse des VP1-Gens nach Patienten und eingesandtem Material zeitlich sortiert. Die Nummerierung von Patienten und Proben entspricht der Nummerierung aller bearbeiteten Proben in der Studie wie sie in der Tabelle 7 (s. Kapitel 2) dargestellt ist. Bei den aufgeführten AS-Mutationen steht die AS-Abkürzung des Archetyps (links) vor der VP1-AS-Nummer, während die AS-Substitution (rechts) hinter der VP1-AS-Nummer zu sehen ist. Die Markierung der ersten analysierten Probe jedes Patienten erfolgt in lila, und in rosa bei dem Patienten Nr.21 (siehe den ausführlichen klinischen Fall im Kapitel 3.2). *wt =

'Wild Type' bzw. Archetyp, **2XS: Die Probe wurde zweimal sequenziert, (VI): Kreisnummer der Virologie-UKD-Proben.

Die Sequenz der Serumprobe wies bereits die VP1-AS-Substitutionen R75K; S117T; T128A; L158V; N265D/wt; K345R zusammen mit einer viralen Mischpopulation bei der PML-assoziierten-Substitution der AS-Position N265 auf. Am Ende der Untersuchungszeit wurden mehre AS-Substitutionen im Serum als auch im Liquor identifiziert. Im Serum wurden die VP1-AS-Substitutionen K60N; R75K; S117T; T128A; L158V; K345R und im Liquor die Substitutionen: K60N; R75K; S117T; T128A; Q155R; L158V; K345R identifiziert. Die NCCR-Region wurde aus 3 Proben (zwei Seren und dem letzten Liquor des Patienten) sequenziert und erwiesen sich als unverändert. Alle Proben wiesen eine 21-bp-Deletion beim f-Block und eine 79bp-Deletion beim Ende des c-Blocks und Anfang des d-Blocks auf, wo stattdessen eine neue 61bp-Insertion inkorporiert wurde. Diese Insertion schließt die NCCR-Abschnitte in der folgenden Reihenfolge ein: Ende von d-, ganzer E- und Anfang von f-Block und einen zusätzlichen c-Block-Anfang.

Der Patient Nr.4 weist eine Entwicklung der VP1-Substitutionen im Laufe des Überwachungszeitraums auf. Die erste Liquorprobe, die positiv mit einer geringen JC-Viruslast von 45 K/ml getestet wurde, wies eine virale Mischpopulation mit den VP1-AS-Substitutionen V27F und R75K auf. Ein Stamm der Mischpopulation verblieb mit der Zeit nur mit der Substitution V27F. Mit einem ca. 100 fachem Anstieg der Viruslast auf 4980 K/ml waren nach sieben Monaten multiple VP1-Substitutionen nachzuweisen, die mit dem PML-assoziierten Mutationsmuster vergleichbar sind: A2G; R75K; S117T; T128A; L158V; F251L; S269F; K345R. Bei der NCCR-Region ist ein differenziertes Muster zwischen Liquor und Serum zu sehen. In beiden Materialien ist eine Deletion des ganzen D- und Teils von f-Block zu sehen. Allerdings ist jeweils eine unterschiedliche Insertion zu finden. Im Serum wurde eine 62bp-Insertion im c-Block von verschiedenen Blockabschnitten in folgender Reihenfolge analysiert: Ende des d- und Teil des E-Blocks, Ende des b- und Teil des c-Blocks. Im Liquor dagegen wurde eine 98bp-Insertion im f-Block aus verschiedenen NCCR-Teilen in folgender Reihenfolge integriert: E-Block, Anfang des f-Blocks und Teil des b- und c-Blocks.

Patient	Probe	Eingang	NCCR-Länge	Material/ Amplifikat	Viruslast k _{mp} /ml	NCCR-Sequenz-Analyse*
1	1	2015-01-30	234bp	Liquor (A803)-RG2	55.700	ORI - A - B - C - dstart - $\Delta_{\text{C}}(\text{cend-D})_{84bp}(90-173)$ - INS_c_71bp(90-160) [[dend-E]_21bp(176-196)] + [b-estart]_50bp(239-285) - dend - E - fstart - $\Delta_{\text{f}}_{19bp}(220-238)$ - fend
2	2	2015-01-30	234bp	Serum (A804)-RG2	18.300	ORI - A - B - C - dstart - $\Delta_{\text{C}}(\text{cend-D})_{86bp}(90-175)$ - INS_c_71bp(90-161) [[dend-E]_21bp(176-196)] + [b-estart]_50bp(239-285) - dend - E - fstart - $\Delta_{\text{f}}_{19bp}(220-238)$ - fend
3	3	2015-01-06	234bp	Liquor (F648)-RG1	17.158,322	ORI - A - B - C - dstart - $\Delta_{\text{C}}(\text{cend-D})_{86bp}(90-175)$ - INS_c_71bp(90-161) [[dend-E]_21bp(176-196)] + [b-estart]_50bp(239-285) - dend - E - fstart - $\Delta_{\text{f}}_{19bp}(220-238)$ - fend
4	4	2015-02-19	234bp	Liquor (Z809)-RG2	6.818	ORI - A - B - C - dstart - $\Delta_{\text{C}}(\text{cend-D})_{84bp}(90-173)$ - INS_c_71bp(90-160) [[dend-E]_21bp(176-196)] + [b-estart]_50bp(239-285) - dend - E - fstart - $\Delta_{\text{f}}_{19bp}(220-238)$ - fend
2	13	2015-03-17	324bp	Liquor (J2422)-RG2	295.000	ORI - A - B - C - dstart - INS_d_74bp (122-295) [[bend-C]_41(114)] - D - E - $\Delta_{\text{f}}_{24bp}(200-223)$
14	2015-04-09	324bp	Liquor (I6136)-RG2	604.000	ORI - A - B - C - dstart - INS_d_74bp (122-295) [[bend-C]_41(114)] - D - E - $\Delta_{\text{f}}_{24bp}(200-223)$	
15	2015-04-28	324bp	Liquor (I9234)-RG1	1.370.000	ORI - A - B - C - dstart - INS_d_74bp (122-295) [[bend-C]_41(114)] - D - E - $\Delta_{\text{f}}_{24bp}(200-223)$	
17	2015-04-01	324bp	Liquor (I4922)-RG2	924.000	ORI - A - B - C - dstart - INS_d_74bp (122-295) [[bend-C]_41(114)] - D - E - $\Delta_{\text{f}}_{24bp}(200-223)$	
3	19	2015-03-23	228bp	Serum (I3455)-RG2	7.020	ORI - A - B - C - dstart - $\Delta_{\text{C}}(\text{cend-D})_{79bp}(94-172)$ - INS_c_61bp(94-154) [[dend-E]_start] - dend - E - fstart - $\Delta_{\text{f}}_{19bp}(220-238)$ - fend
23	2015-06-11	228bp	Liquor (Z5819)-RG1	734.484	ORI - A - B - C - dstart - $\Delta_{\text{C}}(\text{cend-D})_{79bp}(94-172)$ - INS_c_61bp(94-154) [[dend-E]_start] - dend - E - fstart - $\Delta_{\text{f}}_{19bp}(220-238)$ - fend	
24	2015-06-11	228bp	Serum (Z5820)-RG1	53.104	ORI - A - B - C - dstart - $\Delta_{\text{C}}(\text{cend-D})_{79bp}(94-172)$ - INS_c_61bp(94-154) [[dend-E]_start] - dend - E - fstart - $\Delta_{\text{f}}_{19bp}(220-238)$ - fend	
29	2015-05-28	228bp	Serum (Z3880)-RG1	1.350	ORI - A - B - C - dstart - $\Delta_{\text{C}}(\text{cend-D})_{80bp}(94-173)$ - INS_c_62bp(94-155) [[dend-E]_start] - dend - E - fstart - $\Delta_{\text{f}}_{19bp}(220-238)$ - fend	
30	2015-05-28	261bp	Liquor (Z3879)-RG1	4.980	ORI - A - B - C - dstart - $\Delta_{\text{C}}(\text{cend-D})_{80bp}(94-173)$ - INS_c_62bp(94-155) [[dend-E]_start] - dend - E - fstart - $\Delta_{\text{f}}_{19bp}(220-238)$ - fend	
5	31	2015-05-09	298bp	Serum (Z0906)-RG2	880	ORI - A - B - C - dstart - $\Delta_{\text{C}}(\text{cend-D})_{81bp}(94-174)$ - INS_c_63bp(94-156) [[dend-E]_start] - dend - E - fstart - $\Delta_{\text{f}}_{19bp}(220-238)$ - fend
32	2015-07-08	298bp	Serum (Z0206)-RG2	68110	ORI - A - B - C - dstart - $\Delta_{\text{C}}(\text{cend-D})_{81bp}(94-174)$ - INS_c_63bp(94-156) [[dend-E]_start] - dend - E - fstart - $\Delta_{\text{f}}_{19bp}(220-238)$ - fend	
33	2015-07-08	298bp	Liquor (Z0205)-RG1	4.897	ORI - A - B - C - dstart - $\Delta_{\text{C}}(\text{cend-D})_{81bp}(94-174)$ - INS_c_63bp(94-156) [[dend-E]_start] - dend - E - fstart - $\Delta_{\text{f}}_{19bp}(220-238)$ - fend	
6	34	2015-05-04	195bp	Serum (I1962)-RG2	390	ORI - A - B - C - dstart - $\Delta_{\text{C}}(\text{cend-D})_{33bp}(12-74)$ - E - fstart - $\Delta_{\text{f}}_{39bp}(206-244)$ - fend
35	2015-05-04	195bp	Liquor (I1951)-RG2	304.455	ORI - A - B - C - dstart - $\Delta_{\text{C}}(\text{cend-D})_{33bp}(12-74)$ - E - fstart - $\Delta_{\text{f}}_{39bp}(206-244)$ - fend	
36	2015-06-17	195bp	Liquor (I9856)-RG2	198.920	ORI - A - B - C - dstart - $\Delta_{\text{C}}(\text{cend-D})_{33bp}(12-74)$ - E - fstart - $\Delta_{\text{f}}_{39bp}(206-244)$ - fend	
38	2015-06-17	195bp	Serum (Z6921)-RG2	229	ORI - A - B - C - dstart - $\Delta_{\text{C}}(\text{cend-D})_{33bp}(12-74)$ - E - fstart - $\Delta_{\text{f}}_{39bp}(206-244)$ - fend	
7	42	2015-08-07	274bp	Serum (Z3575)-RG2	4.865	ORI - A - B - C - dstart - $\Delta_{\text{C}}(\text{cend-D})_{55bp}(126-194)$ - dend - E - fstart - $\Delta_{\text{f}}_{19bp}(220-238)$ - fend
43	2015-08-07	287bp	Liquor (Z3540)-RG1	508.000	ORI - A - B - C - dstart - $\Delta_{\text{C}}(\text{cend-D})_{55bp}(126-194)$ - dend - E - fstart - $\Delta_{\text{f}}_{19bp}(220-238)$ - fend	
8	44	2015-09-09	255bp	Liquor (40546)-RG2	2.130	ORI - A - B - C - dstart - $\Delta_{\text{C}}(\text{cend-D})_{69bp}(113-181)$ - E - fstart - $\Delta_{\text{f}}_{19bp}(220-238)$ - fend
46	2014-10-14		Liquor (46029)-RG2	1.820	ORI - A - B - C - dstart - $\Delta_{\text{C}}(\text{cend-D})_{69bp}(113-181)$ - E - fstart - $\Delta_{\text{f}}_{19bp}(220-238)$ - fend	
9	45	2015-03-10	277bp	Serum (I1106)-RG2	33.000	ORI - A - B - C - dstart - $\Delta_{\text{C}}(\text{cend-D})_{69bp}(113-181)$ - E - fstart - $\Delta_{\text{f}}_{19bp}(220-238)$ - fend
10	54	2015-09-23	249bp	Liquor (42782)-RG2	207.60	ORI - A - B - C - dstart - $\Delta_{\text{C}}(\text{cend-D})_{69bp}(113-181)$ - E - fstart - $\Delta_{\text{f}}_{19bp}(220-238)$ - fend
12	64	2015-11-26	285bp	Liquor (I4052E)-RG2	1.835	ORI - A - B - C - dstart - $\Delta_{\text{C}}(\text{cend-D})_{69bp}(113-181)$ - E - fstart - $\Delta_{\text{f}}_{19bp}(220-238)$ - fend
13	67	2015-03-26	249bp	Serum (I4052E)-RG2	1.440	ORI - A - B - C - dstart - $\Delta_{\text{C}}(\text{cend-D})_{69bp}(113-181)$ - E - fstart - $\Delta_{\text{f}}_{19bp}(220-238)$ - fend
14	70	2014-02-15	287bp	HE (8175)-RG2	331.000,000	ORI - A - B - C - dstart - $\Delta_{\text{C}}(\text{cend-D})_{69bp}(113-181)$ - E - fstart - $\Delta_{\text{f}}_{19bp}(220-238)$ - fend
15	71	2014-09-09	181bp	Liquor (41876)-RG2	76.950	ORI - A - B - C - dstart - $\Delta_{\text{C}}(\text{cend-D})_{69bp}(113-181)$ - E - fstart - $\Delta_{\text{f}}_{19bp}(220-238)$ - fend
72	2014-09-09	181bp	Serum (41877)-RG2	12.180	ORI - A - B - C - dstart - $\Delta_{\text{C}}(\text{cend-D})_{69bp}(113-181)$ - E - fstart - $\Delta_{\text{f}}_{19bp}(220-238)$ - fend	
16	73	2014-03-14	234bp	Liquor (Z2572)-RG2	941	ORI - A - B - C - dstart - $\Delta_{\text{C}}(\text{cend-D})_{69bp}(113-181)$ - E - fstart - $\Delta_{\text{f}}_{19bp}(220-238)$ - fend
74	2014-03-14	198bp	Serum (Z2573)-RG2	46.653	ORI - A - B - C - dstart - $\Delta_{\text{C}}(\text{cend-D})_{69bp}(113-181)$ - E - fstart - $\Delta_{\text{f}}_{19bp}(220-238)$ - fend	
17	76	2015-07-02	323bp	Liquor (Z8276)-RG2	10.979,275	ORI - A - B - C - dstart - $\Delta_{\text{C}}(\text{cend-D})_{69bp}(113-181)$ - E - fstart - $\Delta_{\text{f}}_{19bp}(220-238)$ - fend
21	84	2013-03-27	235bp	Liquor (I4122)-RG2	1.189,478	ORI - A - B - C - dstart - $\Delta_{\text{C}}(\text{cend-D})_{69bp}(113-181)$ - E - fstart - $\Delta_{\text{f}}_{19bp}(220-238)$ - fend
85	2013-02-19	235bp	Liquor (Z7878)-RG2	698,010	ORI - A - B - C - dstart - $\Delta_{\text{C}}(\text{cend-D})_{69bp}(113-181)$ - E - fstart - $\Delta_{\text{f}}_{19bp}(220-238)$ - fend	
86	2013-05-15	235bp	Liquor (Z1758)-RG2	584,000	ORI - A - B - C - dstart - $\Delta_{\text{C}}(\text{cend-D})_{69bp}(113-181)$ - E - fstart - $\Delta_{\text{f}}_{19bp}(220-238)$ - fend	
87	2013-01-08	235bp	Liquor (I0316)-RG2	242,805	ORI - A - B - C - dstart - $\Delta_{\text{C}}(\text{cend-D})_{69bp}(113-181)$ - E - fstart - $\Delta_{\text{f}}_{19bp}(220-238)$ - fend	
88	2013-01-22	244bp	Serum (Z3423)-RG2	1.450,000	ORI - A - B - C - dstart - $\Delta_{\text{C}}(\text{cend-D})_{69bp}(113-181)$ - E - fstart - $\Delta_{\text{f}}_{19bp}(220-238)$ - fend	
89	2013-02-26	244bp	Serum (I0945)-RG2	86,680	ORI - A - B - C - dstart - $\Delta_{\text{C}}(\text{cend-D})_{69bp}(113-181)$ - E - fstart - $\Delta_{\text{f}}_{19bp}(220-238)$ - fend	
90	2013-03-08	244bp	Serum (I0945)-RG2	2.299,800	ORI - A - B - C - dstart - $\Delta_{\text{C}}(\text{cend-D})_{69bp}(113-181)$ - E - fstart - $\Delta_{\text{f}}_{19bp}(220-238)$ - fend	
91	2013-04-15	235bp	Serum (I7073)-RG2	5,000,000	ORI - A - B - C - dstart - $\Delta_{\text{C}}(\text{cend-D})_{69bp}(113-181)$ - E - fstart - $\Delta_{\text{f}}_{19bp}(220-238)$ - fend	
92	2013-04-30	244bp	Serum (I9201)-RG2	520,470	ORI - A - B - C - dstart - $\Delta_{\text{C}}(\text{cend-D})_{69bp}(113-181)$ - E - fstart - $\Delta_{\text{f}}_{19bp}(220-238)$ - fend	
94	2013-01-06	244bp	Urin (46098)-RG2	511,200,000	ORI - A - B - C - dstart - $\Delta_{\text{C}}(\text{cend-D})_{69bp}(113-181)$ - E - fstart - $\Delta_{\text{f}}_{19bp}(220-238)$ - fend	
95	2013-01-07	244bp	Urin (6933)-RG2	1.130,000,000	ORI - A - B - C - dstart - $\Delta_{\text{C}}(\text{cend-D})_{69bp}(113-181)$ - E - fstart - $\Delta_{\text{f}}_{19bp}(220-238)$ - fend	
96	2013-01-21	244bp	Urin (Z0523)-RG2	156,300,000	ORI - A - B - C - dstart - $\Delta_{\text{C}}(\text{cend-D})_{69bp}(113-181)$ - E - fstart - $\Delta_{\text{f}}_{19bp}(220-238)$ - fend	
97	2013-02-06	244bp	Urin (S610)-RG2	76,800,000	ORI - A - B - C - dstart - $\Delta_{\text{C}}(\text{cend-D})_{69bp}(113-181)$ - E - fstart - $\Delta_{\text{f}}_{19bp}(220-238)$ - fend	
98	2013-02-15	244bp	Urin (Z2801)-RG2	642,000,000	ORI - A - B - C - dstart - $\Delta_{\text{C}}(\text{cend-D})_{69bp}(113-181)$ - E - fstart - $\Delta_{\text{f}}_{19bp}(220-238)$ - fend	
99	2013-03-27	244bp	Urin (I4076)-RG2	85,800,000	ORI - A - B - C - dstart - $\Delta_{\text{C}}(\text{cend-D})_{69bp}(113-181)$ - E - fstart - $\Delta_{\text{f}}_{19bp}(220-238)$ - fend	
100	2013-05-14	244bp	Urin (I1663)-RG2	1,788,000,000	ORI - A - B - C - dstart - $\Delta_{\text{C}}(\text{cend-D})_{69bp}(113-181)$ - E - fstart - $\Delta_{\text{f}}_{19bp}(220-238)$ - fend	
102	2013-01-16	244bp	Urin (Z224)-RG2	110,100,000	ORI - A - B - C - dstart - $\Delta_{\text{C}}(\text{cend-D})_{69bp}(113-181)$ - E - fstart - $\Delta_{\text{f}}_{19bp}(220-238)$ - fend	
104	2013-03-27	244bp	RNAK (I4121)-RG2	61,140	ORI - A - B - C - dstart - $\Delta_{\text{C}}(\text{cend-D})_{69bp}(113-181)$ - E - fstart - $\Delta_{\text{f}}_{19bp}(220-238)$ - fend	

Tabelle 23: Darstellung der Sequenzanalyse der NCCR-Region nach Patienten und eingesandtem Material zeitlich sortiert. Die Nummerierung von Patienten und Proben entspricht der Nummerierung aller bearbeiteten Proben in der Studie wie sie in der Tabelle 7 (s. Kapitel 2) aufgeführt sind. Die Markierung der ersten analysierten Probe jedes Patienten erfolgt in hell-blau, und in rosa bei dem Patienten Nr.21 (siehe den

ausführlichen klinischen Fall im Kapitel 3.2). Weiterhin sind die Deletionen (Δ) in Orange und die Insertionen (**INS**) in fett-blau geschrieben. Die jeweilige NCCR-Länge in grün entspricht die Länge der NCCR nach den Deletionen und Insertionen bei der jeweiligen Sequenz, während sich die **grünen Zahlen** innerhalb der Sequenzanalyse auf die Nummerierung der bestimmten umgeordneten Sequenz beziehen. Die Zahlen in blau entsprechen stets der archetypischen Nummerierung der Sequenzblockabschnitte vor der Insertion (beim Archetyp) (Hansjürgen T. Agostini et al., 1997; Ault, 1997; Gosert et al., 2010; Yogo et al., 1990).

Beim **Patienten Nr.5** wurden innerhalb von 2 Monaten 2 Serum-Proben für das Gen VP1 sequenziert. Trotz der steigenden Viruslast innerhalb von 2 Monaten (von 880 K/ml auf 68.110 K/ml) blieben die Sequenzen bis auf zwei neue AS-Positionen unverändert. Die zwei Proben wiesen die Substitutionen K60N; R75K; S117T; T128A; Q155R; L158V auf. Allerdings war bei der R75-AS-Stelle der ersten Serumprobe eine virale Mischpopulation zu entdecken, die zum Teil archetypisch, d.h. ohne Mutation vorkam. Darüber hinaus war die erste Probe positiv für noch eine weitere AS-Substitution des VP1, nämlich die K345R. Drei Proben des Patienten (2 Serumproben und ein Liquor) wurden in der NCCR-Region sequenziert. Alle zeigten ein identisches Muster mit einer 56bp-Deletion beim d-Block, einer 19bp-Deletion beim f-Block und einer langen 106bp-Insertion innerhalb des f-Blocks, zusammengesetzt aus verschiedenen Blockschnitten in folgender Reihenfolge: Ende von b-, ganzer C-Block, Ende von d-, ganzer E- und Anfang von f- Block.

Beim **Patienten Nr.6** wurden innerhalb des ersten Monats die gleiche VP1-AS-Substitutionen im Liquor und Serum identifiziert: N74S; R75K; T128A; L158V; S269F; K345R. Die AS-Substitution K345R war bei einer der 2 entnommenen Liquor-Proben von demselben Tag nicht vorhanden. Aus diesem Grund gehen wir wegen dieser AS-Stelle von einer viralen Mischpopulation aus und dies ebenfalls bei der Sequenzierung der NCCR-Region. Die vier Proben (2 Liquor-, 2 Serum-Proben) erwiesen sich als identisch bezüglich zweier Deletionen: einer 33bp-Deletion im d-Block und einer 39bp-Deletion im f-Block.

Der **Patient Nr.7** wies Unterschiede zwischen Serum und Liquor bei der Sequenzierung sowohl des VP1 als auch der NCCR-Region auf. Bei der Serumprobe wurden die VP1-Substitutionen R75K; S269F; E322K/wt nachgewiesen. Die letzte Substitution (322K) war nur zum Teil nachweisbar, was auf eine virale Mischpopulation bei der Charakterisierung dieser AS-Stelle hindeutet. Die Liquorprobe schloss eine Mischpopulation ein: ein Stamm

zeigte eine archetypische VP1-Sequenz ohne Mutationen, während eine zeitgleiche Sequenzierung von Produkten anderer PCR-Thermalprotokolle die neuen AS-Substitutionen R75K; wt/S267F des VP1 aufwies. Die AS-Substitution R75K kommt auch bei einigen Stämmen als einzige AS-Substitution des VP1 vor. Dieser Fall könnte als ein Beispiel für aktive Veränderungen des VP1 bzw. einer parallelen Existenz von Archetyp und Mutanten-Stämmen im Liquor gelten. Die Sequenzierung der NCCR-Region weist ebenfalls Unterschiede zwischen Serum und Liquor auf. In beiden Materialien sind zwei identische Deletionen, nämlich eine von 55bp im d-Block und eine von 19bp im f-Block zu finden. Dennoch ist beim Serum und Liquor eine unterschiedliche Insertion im f-Block nachgewiesen worden, die praktisch die gleichen Blockabschnitte mit geringen Basen- und Länge-Differenzen inkorporierte. Die Insertion im f-Block besteht aus folgenden Blockabschnitten:

Serum(81bp): Ende von b-, erster Teil von c- Block, Ende von c- und Anfang von Block d-, Ende von d- und ganzer E- und

Liquor(94bp): Ende von b-, ganzer C-Block, Ende von d- und ganzer E- Block.

Beim **Patienten Nr.8** ist eine VP1-Sequenz von einer Liquor-Probe mit einer Viruslast mit 2.130K/ml vorhanden. Die Sequenz weist die Mutationen: R75K; S117T; T128A; L158V; N265S; K345R auf. Dieselbe Probe weist das NCCR-Muster der 69bp-Deletion in dem d-Block und der 19bp-Deletion zusammen mit einer 75bp-Insertion im f-Block auf. Die Insertion stammt aus verschiedenen Blockabschnitten in der Reihenfolge: Ende von b-, ganzer C-Block, ganzer E- und Anfang von f- Block.

Beim **Patienten Nr.9** ist eine VP1-Sequenz von einer Serum-Probe mit einer Viruslast von 33.000 K/ml vorhanden. Die Sequenz weist die Mutationen: R75K; S117T; T128A; L158V; N265S; K345R auf. Dieselbe Probe wurde mittels NCCR-Sequenzierung analysiert und zeigte die folgende Umordnungen: Eine 1bp-Deletion und noch eine 56bp-Deletion im d-Block, wo parallel eine 88bp-Insertion integriert wurde und eine 21bp-Deletion im f-Block. Die erwähnte Insertion im d-Block besteht aus einem Teil von dem a- (TATA), dem ganzen B-, einem Teil vom c- Block und anschließend aus dem Ende des c- und dem Anfang des d-Blocks.

Der **Patient Nr.10** weist in zwei untersuchten Liquor-Proben (13.841 K/ml und 20.760 K/ml) innerhalb eines Monats die identischen VP1-AS-Substitutionen R75K; F263Y; S269Y auf. Die analysierte NCCR-Region der zweiten Liquor-Probe zeigte auch bei ihm ein auffälliges Umordnungsmuster mit einer 12bp-Deletion im b-Block und einer gleichzeitigen 54bp-Insertion im C-Block. Nach dem normalen Ende des c-Blocks und dem ganzen C-Block sind 2 Deletionen, eine von 39bp im d-Block und eine von 19bp im f-Block zu finden.

Der Patient Nr.11 weist in 3 Proben innerhalb von 2,5 Monaten auffällige AS-Substitutionen in der VP1-Region auf. Die JC-Sequenz der ersten Liquorprobe (77 K/ml) ist archetypisch mit keiner beschriebenen VP1-AS-Substitution. Nach 2,5 Monaten hat ein Mutationsprozess im JCV-VP1-Gen stattgefunden. Die Analyse der neuen Liquorprobe (390 K/ml) deckte 6 neuen AS-Substitutionen auf: K60N; R75K; S117T; T128A; L158V; K345R während die Analyse der zeitgleichen Serum-Probe (2.460 K/ml) nicht alle der vorerwähnten AS-Substitutionen zeigte: N74S; R75K; T128A; L158V; K345R. Die Analyse der NCCR-Region ist mehrmals nicht auswertbar gewesen.

Der **Patient Nr.12** weist in einer Liquor-Probe (1.835K.ml) sechs AS-VP1-Substitutionen auf: T4Q; L55F/wt; N74S; R75K; T128A; L158V. Die Sequenz der AS-Position L55 ist zum Teil archetypisch, was auf eine Mischpopulation bei vorhandenem Mutierungsprozess hindeuten könnte. Die NCCR-Region der gleichen Liquor-Probe zeigte ein auffälliges Umordnungsmuster mit einer 67bp-Deletion im d-Block, einer 9bp-Deletion in f-Block und einer darin inkorporierten 94bp Insertion bestehend aus dem Ende des b-Blocks, dem C- und e-Block und einem wiederholten Beginn des f-Blocks.

Bei dem Patienten Nr. 13 ist eine sehr auffällige Sequenz der VP1-Gen Region in Serum (1.440 K/ml) und Liquor (4.140 K/ml) nachzuweisen: beide Proben wurden am gleichen Tag entnommen, allerdings zeigen sie ein unterschiedliches Mutationsmuster bis auf eine gemeinsame AS-Substitution an AS-Stelle R75. Im Detail sind im Serum nur die 2 AS-Substitutionen R75K und S269Y (PML-assoziiert) zu finden, während im Liquor die AS-Substitutionen D66H; N74S; R75K; T128A; L158V; K345R nachgewiesen wurden. Die NCCR-Sequenzanalyse war beim Serum erfolgreich und zeigte die folgende Umordnungen:

eine 40bp-Insertion im c-Block von einer duplizierten c-Block-Hälfte, eine 39bp-Deletion des d-Blocks und eine 19bp-Deletion des f-Blocks.

Der Patient Nr. 14 weist ein ähnliches Mutationsmuster im Serum (1050 K/ml) und in seiner Hirnbiopsie (351.000.000 K/ml) auf bis auf eine zusätzliche Substitution im Serum (K60N). Im Serum wurden die VP1-AS-Substitutionen K60N; R75K; S117T; T128A; L158V; K345R und in der Hirnbiopsie R75K; S117T; T128A; L158V; K345R nachgewiesen. Dieselbe Hirnbiopsie weist ein NCCR-Muster mit einer 23bp-Deletion im c- und d-Block mit gleichzeitiger 20bp-Insertion im c-Block, einer anschließenden 44-bp-Deletion im d-Block und einer 19bp-Deletion im f-Block auf. Die Insertion von verschiedenen Blockabschnitten im c-Block zeigt die Reihenfolge: Ende vom a-, und Beginn des b- Blocks.

Der Patient Nr. 15 weist in seiner Liquorprobe (76.950 K/ml) nur eine einzige VP1-AS-Substitution L55F auf, während in derselben Probe als auch im Serum (12.180 K/ml) vom gleichen Tag das identische NCCR-Muster nachgewiesen wurde. Die Umordnungen der NCCR-Region in beiden Proben schließen eine 86bp- und eine 19bp- Deletion entsprechend im d- und f- Sequenzblock und eine 18bp-Insertion im c-Block von verschiedenen kürzeren d-Basenabschnitten ein.

Beim Patienten Nr. 16 sind in einer Serumprobe (46.653 K/ml) die VP1-AS-Substitutionen R75K; L158V; S269Y zu finden. Dieselbe Probe weist in der NCCR-Region eine 32bp-Deletion im b/c-Block zusammen mit einer 28bp-Deletion im d-, eine einzige deletierte Nukleobase im e- und die typische 19bp-Deletion im f- Block auf. Die zuvor erwähnten multiplen Mutationen sind von einer 11bp-Insertion von einem Teil des c-Blocks in d-Block begleitet bzw. gefolgt (s. Kapitel 4). Bei der Liquorprobe vom gleichen Tag (941 K/ml) wurde ein leicht differenziertes NCCR-Muster analysiert, nämlich die Deletionen im b/c- (41bp) und f- (19bp) Sequenzblock mit einer Insertion im d-Block von multiplen kürzeren Sequenzabschnitten wie folgt: Ende vom c-Block, Ende vom d-, Anfang vom e- und erneut der Anfang vom c- Block.

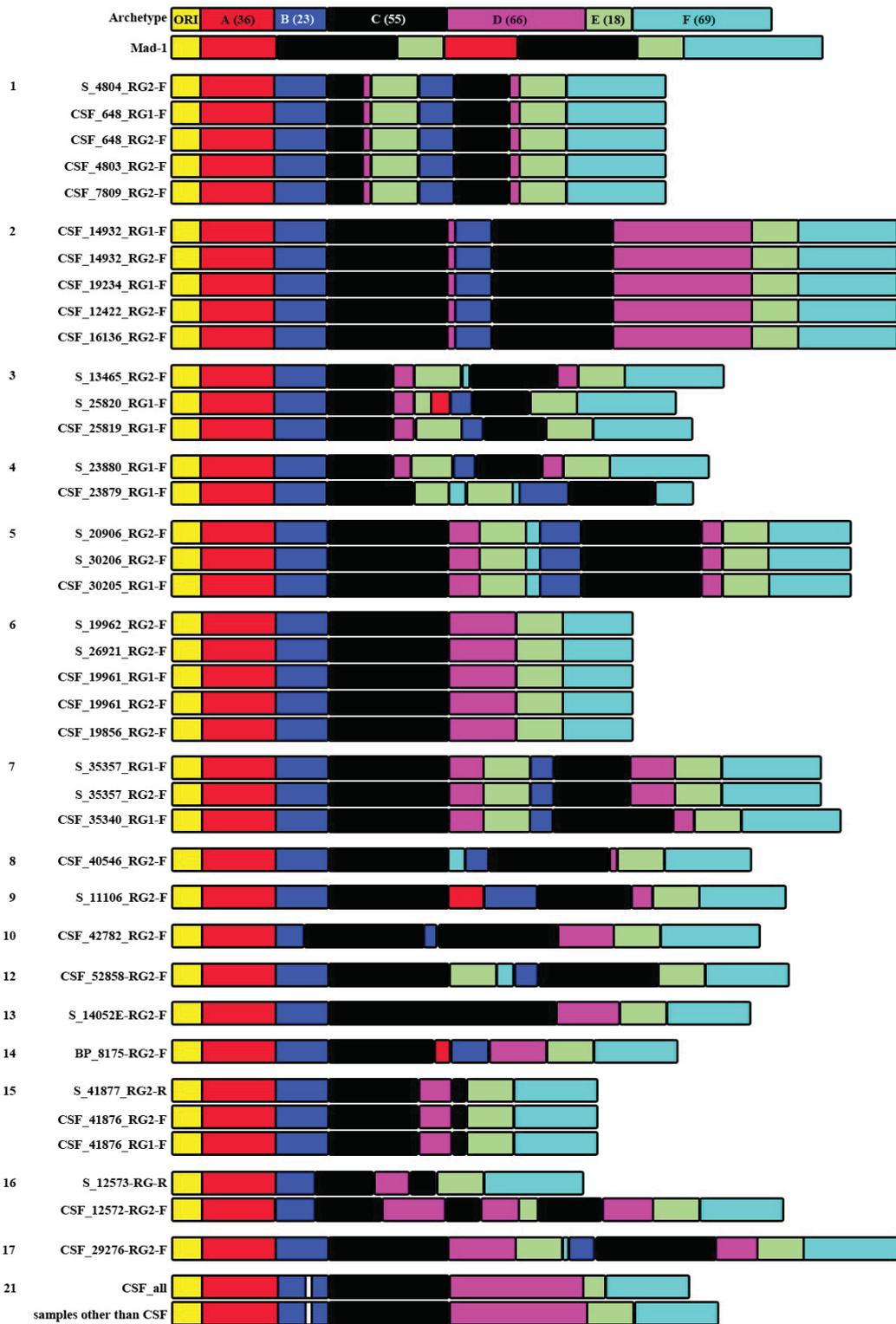


Abb. 16: Schematische Darstellung der NCCR-Umordnungen der Patienten und Proben der Tabelle 23. Oben sind der Archetyp und der PML-Typ Mad1 zum Vergleich dargestellt. Beim Archetyp ist in jeder Box eine Zahl zu sehen, die der Sequenzlänge des jeweiligen Blocks entspricht (A; B; C; D; E; F) (Hansjürgen T. Agostini et al., 1997; Ault, 1997; Gosert et al., 2010; Yogo et al., 1990). **CSF:** Liquor, **S:** Serum, **BP:** ‚Brain-biopsie‘, Hirnbiopsie, **RG1:** PCR-Produkt der ersten *nested* PCR-Runde, **RG2:** PCR-Produkt der zweiten *inner-nested*

PCR-Runde. Links ist die Patienten Nummer zu sehen. Bei dem Patienten Nr.21 sind nur zwei NCCR-Muster dargestellt.

Bei dem Patienten Nr. 17 wurde eine Probe analysiert. Seine JCV-hoch-positive Liquorprobe (10.979275 K/ml) zeigte bei der Sequenzanalyse des VP1-Gens multiple AS-Substitutionen, die zum Teil PML-assoziiert sind: R75K; L158V; N265D; K345R. Dieselbe Probe wurde bei der NCCR-Region analysiert und wies die folgenden Umordnungen auf: zwei Deletionen, nämlich eine von 37bp im d-Block und eine von 19bp bei im f-Block und noch eine 115bp-Insertion im f-Block. Die inkorporierten Sequenzblockschnitte zeigen folgende Reihenfolge: Ende des b-Blocks, den C-Block, das Ende von d- und den ganzen E-Block.

Der Patient Nr.19 wurde nur beim VP1-Gen-Region in einer Liquorprobe (12.165 K/ml) erfolgreich analysiert und wies nur eine einzige AS-Substitution R75K auf.

Von großem Interesse ist **der Patient Nr. 21**, der in den meisten Proben (Serum, Liquor, Urin, KM; s. Tabelle 22) außerordentlich hohe JCV-Viruslasten mit identischen VP1-AS-Substitutionen und sehr konsequentem NCCR-Muster je nach Material aufweist:

Die VP1-AS-Substitutionen sind: E69D; N74S; R75K; S117T; T128A; L158V; K345R, mit einigen Ausnahmen von Proben mit zusätzlichen oder weniger AS-Substitutionen. Die NCCR-Umordnungen bestehen immer aus 2 deletierten Nukleobasen im b-Block und einer 21bp-Deletion im f-Block, die unter allen eingesandten Materialien und während der gesamten Überwachungsperiode des Patienten identisch bleiben. Allerdings, kommt eine zusätzliche 9bp-Deletion im d-/e-Block bei Liquorproben und in einer Serumprobe vor. Darüber hinaus wurde dieser Patient sehr intensiv analysiert, da er einen Nachweis von JCV ohne Zeichen eines neurologischen Defizits aufwies. Die Anamnese und die ausführliche Analyse und Modellen dieses Patienten werden in der Folge in einem getrennten Teil der Ergebnisse (s. Kapitel 3.2) geschildert.

3.2. Ein außergewöhnlicher Fall: massiver JCV-Nachweis im Liquor bei Hyper-IgE-Syndrom der Form DOCK8-Defizienz ohne Hinweis auf das Vorliegen einer PML

3.2.1. Anamnese und klinischer Verlauf des Patienten Nr.21

Im Mittelpunkt dieses Abschnitts steht der klinische Fall des hämatologischen Patienten Nr.21 (s. Tabelle 7, Materialien und Methoden). Es handelt sich um eine 13jährige Patientin konsanguiner Eltern (ARH013.3 in (Engelhardt et al., 2009)). Bei dem Mädchen wurde eine haploidentische Stammzellentransplantation (HSCT) trotz erhöhter Gefahr aufgrund zahlreicher viraler Infektionen erfolgreich durchgeführt (Ghosh et al., 2014). Die Hauptdiagnose wurde als bestehendes autosomal-rezessives Hyper-IgE-Syndrom im Rahmen der diagnostizierten DOCK-8-Defizienz („*Dedicator of Cytokines 8 Deficiency*“) definiert.

Die Patientin litt ständig unter einer Hypogammaglobulinämie und einer CD4-Lymphopenie. Anamnestisch fanden sich folgende ältere und aktuelle schwere infektiologische Diagnosen:

1. rezidivierende **virale** Infektionen:

- **EBV**-assoziiertes Burkitt-Lymphom retropharyngeal (erfolgreiche Therapie laut B-NHL-BFM 2004 Protokoll: 01.07)
- **CMV**-Reaktivierungen: CMV-Meningitis, CMV-Papillitis/Chorioretinitis mit entzündlichen Infiltraten im Glaskörper links.
- **Herpes** (HSV)-Reaktivierung: Herpeskeratits, Herpes labialis und anogenitale ulzerierende HSV1-Dermatitis
- intermittierende **Adenovirus (ADV)**-Ausscheidung im respiratorischen Material und im Urin
- intermittierender Nachweis von **HHV6** im respiratorischen Material
- **BKV** Nachweis im Blut und massive Ausscheidung im Urin
- **JCV**-Reaktivierung im Blut, im Knochenmark und im Urin und massive Replikation im Liquor und Blut

2. rezidivierenden bakterielle Infektionen:

- chronische Otitis media
- rezidivierende Pneumonien
- rezidivierende Bronchitiden
- rezidivierende Haut-Abszesse
- Z.n. Sepsis mit Nachweis von *Staphylococcus aureus*

Trotz der regelmäßigen intravenösen Immunglobulin-Substitution und der antiviralen Prophylaxe entwickelte die Patientin wiederholt schwere Infektionen wie oben genannt. Kein passender Spender konnte gefunden werden und aufgrund der progressiven Schwere der Infektionen und schlechten Prognose wurde eine haploidente TCR $\alpha\beta$ -/CD19 depletierte Blut-Stammzelltransplantation von ihrem blutkompatiblen (A Rh pos.) Vater an 2 hintereinander liegenden Tagen am 11-12.12.12 (Tag 0a und Tag 0b) mit einer Zellzahl von insgesamt $12,7 \times 10^8$ WBC/kg, $13,82 \times 10^6$ CD34⁺ Zellen/kg und $5,22 \times 10^3$ CD3⁺ $\alpha\beta$ Zellen/kg durchgeführt.

Die Konditionierung, d.h. die Behandlung vor der Transplantation der Patientin, erfolgte mit Fludarabin (Tag -8 bis -5), Thiotepa (Tag -4), Melphalan (Tag -3 bis -2) und ATG (Tag -12 bis -9), während die GvHD-Prophylaxe mit Mycophenolat Mofetil (seit Tag -1) erfolgte. Zusätzlich wurde eine antibiotische Prophylaxe mit Ciprofloxacin und Metronidazol und eine antimykotische Prophylaxe mit Caspofungin verabreicht. Aufgrund der anamnestischen viralen Reaktivierungen wurde eine parallele antivirale Prophylaxe mit Ganciclovir durchgeführt. Am zweiten Tag der Transplantation (Tag 0b) wurde die Behandlung der Patientin wegen der HSV1-Nachweise in der Anamnese mit Foscarnet fortgesetzt. Darüber hinaus wurde aufgrund des intermittierenden Adenovirus-Nachweises der Patientin eine zusätzliche i.v. Gabe von Cidofovir im wöchentlichen Abstand verabreicht. Zudem wurden Immunglobuline (jeweils 25gr= 0,5mg/kg) am Tag -1 und am Tag +23 (-: vor und +: nach der Transplantation jeweils) gegeben.

Eine GvHD-Manifestation der Haut in Form eines feinfleckigen Exanthems der Extremitäten konnte unter Prednison und später durch orale Gabe von Hydrokortison therapiert werden. Die durch die Grunderkrankung und bereits vor der Transplantation bestehende ekzematöse Autoimmundermatitis zeigte im Laufe der Immunrekonstitution eine deutliche Besserung.

Die Transplantation wurde gut von der Patientin vertragen und es kam zu keiner relevanten Hämolyse. Nach der Konditionierung trat eine Aplasie-Phase mit mildem Transfusionsbedarf auf. Insgesamt benötigte die Patientin fünf Thrombozytenkonzentrate und zwei Erythrozytenkonzentrate (zuletzt am Tag +8). Die Kriterien für das leukozytäre Engraftment wurden am Tag +8 nach der Tx erreicht. Der im peripheren Blut untersuchte Chimärismus zeigte am Tag 22+ keine autologen Anteile. Ebenso war am Tag 27+ ein vollständiger Spender-Chimärismus bei der Knochenmarkpunktion festzustellen. Die Patientin konnte am Tag +37 nach der Tx bei früher Zell-Rekonstitution und komplettem Spender-Chimärismus entlassen werden. Der erhöhte IgE-Wert vor der Transplantation ging in den Normbereich innerhalb von 2 Wochen zurück.

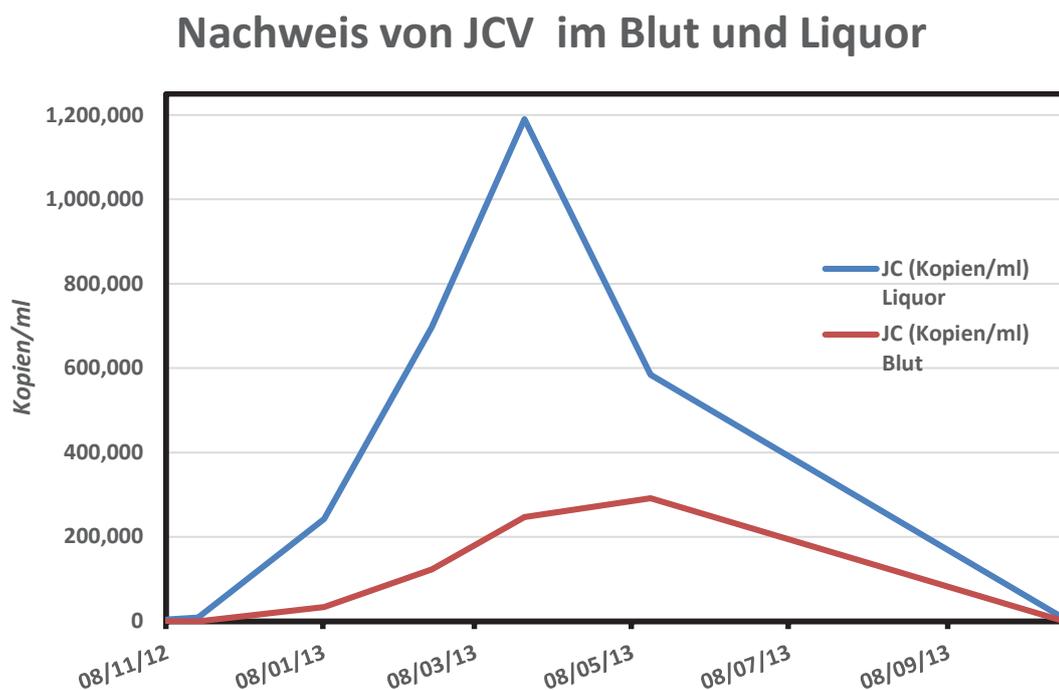


Abb. 17: Die Kinetik der JC-Viruslast im Blut und im Liquor der Patientin im klinischen Verlauf.

3.2.2. JCV-DNA-Nachweise in Liquor, Serum und anderen Körperflüssigkeiten beim Patienten Nr.21

Der JCV-Nachweis im Liquor als auch in weiteren Materialien kam im klinischen Verlauf als Zufallsbefund hinzu, denn die Patientin wurde bereits vor der Transplantation aufgrund der CMV-Meningitis in seiner Anamnese auf alle neurotrophen Viren im Liquor untersucht. Bei konstanter Abwesenheit von PML-Symptomen konnte bei bereits vor der Stammzellentransplantation im Liquor nachweisbare und in der Kontrolllumbalpunktion angestiegene JC-Viruslast im Liquor im weiteren Verlauf auch im peripheren Blut, im Urin und im Rachenspülwasser nachgewiesen werden. Bei Entlassung war die Viruslast im Liquor auf 4×10^5 Kopien/ml angestiegen (s. Abb. 17, Tag +37 nach Tx). Erstaunlicherweise ergaben sowohl die Klinik als auch die verschiedenen Magnetresonanztomographien des Schädels (MRT) vor Verlegung keine Hinweise auf eine PML.

3.2.3. Genetischer Hintergrund des ,DOCK-8'-Defizits

Bei der Patientin ist ein autosomal-rezessives Hyper-IgE-Syndrom, Typ 2 (AR-HIES) seit 6 Jahren vor der Transplantation bekannt gewesen. Genetisch gesehen weist die Patientin ein AR-HIES-Typ2 Immundefizienz-Syndrom mit der homozygoten Deletion des Exons 46 von DOCK8-Gene (*“Dedicator Of CytoKinesis Gene”*) auf (EX46del; c.5961+? del/p.G1988fsX1990) nämlich eine beschriebene AR-HIES-Typ2-assoziierte Mutation des DOCK8-Gens auf.

Das Gen DOCK8 wird in peripheren Leukozyten, im Thymus, in der Milz und in der Leber exprimiert. Das Genprodukt ist das RAC1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate1), ein kleines Bindungs-Protein, das die Aktin-Polymerisierung und Zell-Proliferation fördert.

Folglich führt das DOCK8-Defizit zu einer mangelhaften Aktin-Polymerisierung und weiterhin zu einer defekten Chemokin-vermittelten Migration der T-, B- und NK-Zellen und zu verminderter Produktion von Interferon- α (Bonilla et al., 2016).

Klinisch manifestiert sich das Syndrom bei den meisten Patienten mit häufig auftretenden respiratorischen Infektionen, umfangreichen kutanen viralen Infektionen, hepatischen Auffälligkeiten, T-Zell-Lymphatischer Leukämie, Burkitt- und Non Hodgkin Lymphomen. Das DOCK8-Defizit ist durch erhöhte IgE-Serum-Werte und Eosinophilie charakterisiert,

während die CD8⁺- und vorwiegend die CD4⁺-Zellen eine beschädigte Proliferation und Aktivierung aufweisen (Engelhardt et al., 2009).

3.2.4. Polyomavirus- BK und JC-DNA- Nachweise

Im Blut-, Knochenmark-, Liquor- und Urin- Proben der Patientin zeigte sich zeitgleich zu anderen zuvor erwähnten viralen Manifestationen und Reaktivierungen eine außerordentliche hohe BK-Virus-Ausscheidung im Urin und erhöhte Viruslasten in allen untersuchten klinischen Proben mit Ausnahme der Liquor-Proben (s. Abb. 16, 17, 18. und 19). Das BKV konnte anscheinend die Blut-Hirn-Schranke (BBB) nicht durchdringen.

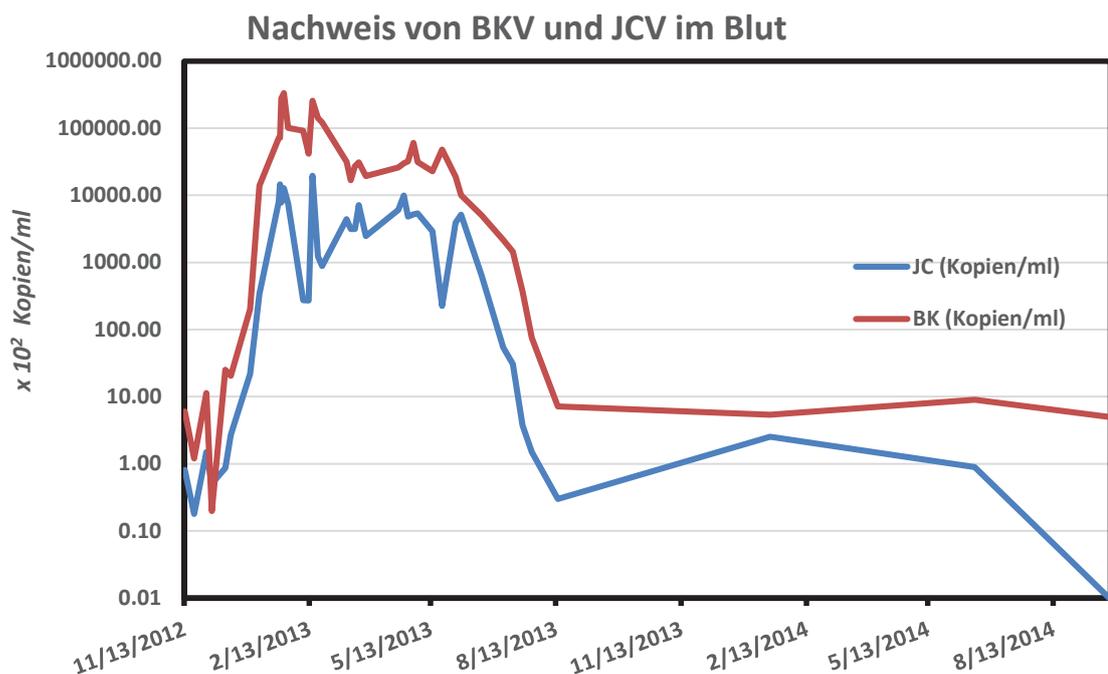


Abb. 18: Die Kinetik der JCV (blaue Linie) und BKV (rote Linie) im Blut der Patientin in logarithmischer Skalierung im zeitlichen Verlauf.

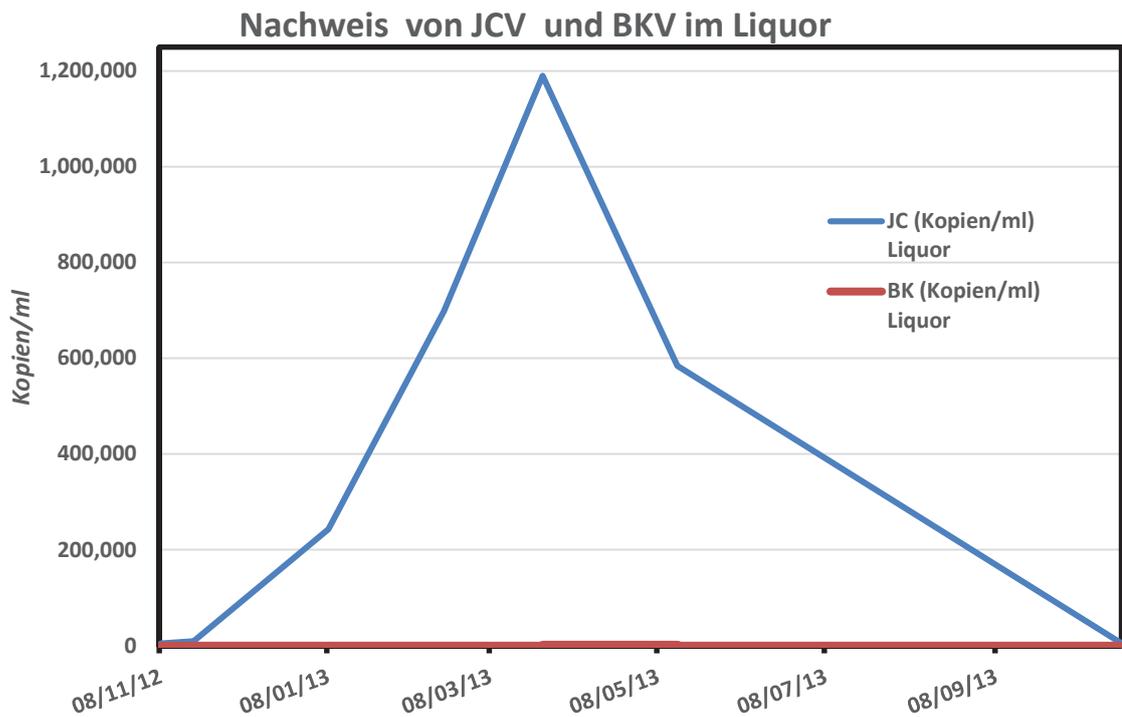


Abb. 19: Graphische Darstellung der Kinetik von JCV (blaue Linie) und BKV (rote Linie) im Liquor der Patientin im zeitlichen Verlauf. Die JCV-Viruslast ist außerordentlich hoch, während das BKV nicht nachweisbar ist.

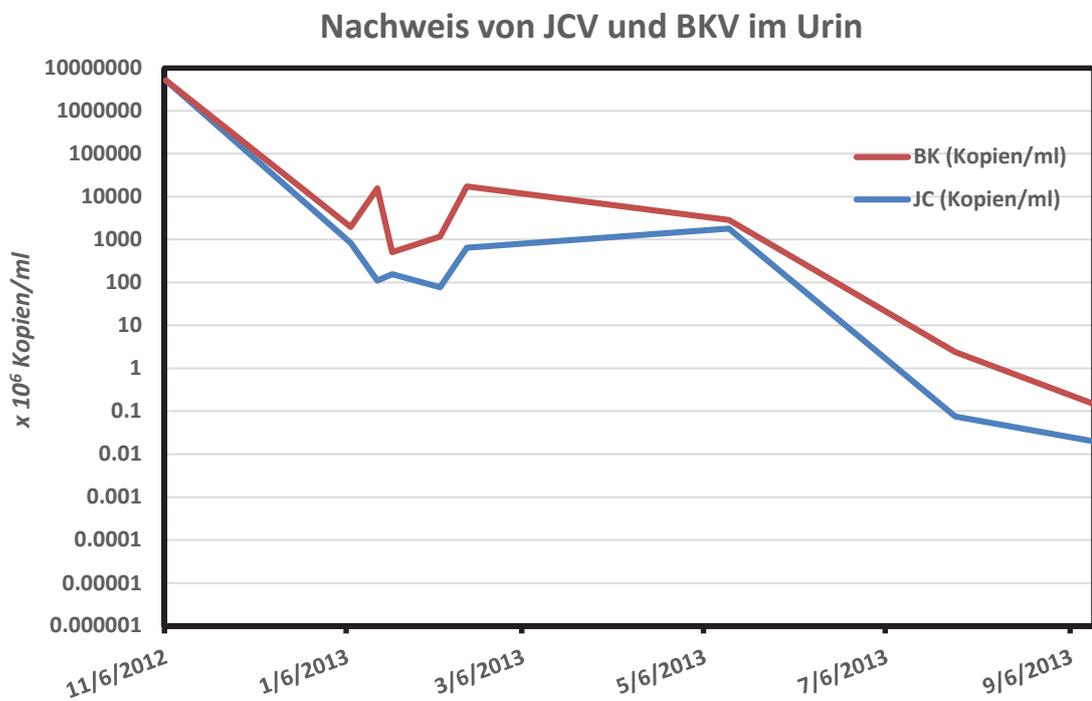


Abb. 20: Graphische Darstellung der Kinetik von JCV (blaue Linie) und BKV (rote Linie) im Urin der Patientin in logarithmischer Skalierung im zeitlichen Verlauf.

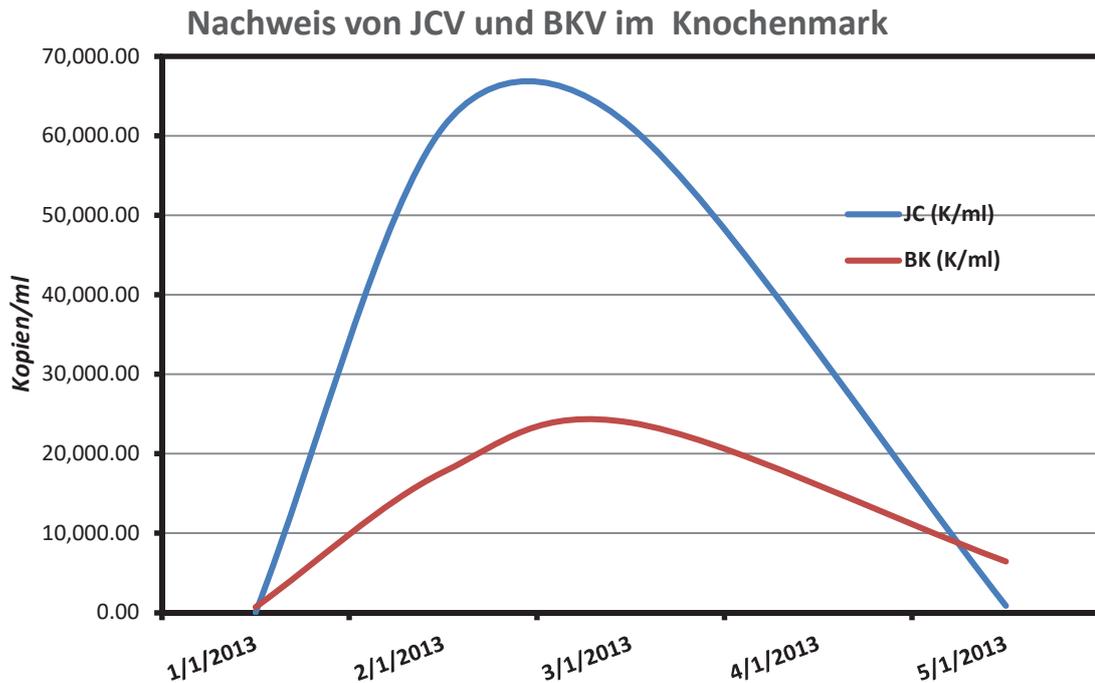


Abb. 21: Graphische Darstellung der Kinetik von JCV (blaue Linie) und BKV (rote Linie) im Knochenmark der Patientin in logarithmischer Skalierung im zeitlichen Verlauf.

3.2.5. PML-assoziierte Mutationen im VP1 bzw. Rearrangements (NCCR) im Genom des Virus beim Patienten Nr.21

Zur Messung der in den Proben enthaltenen Viruslast wurden alle eingesandten Blut-, Urin- und Liquor-Proben per *Realtime-PCR* untersucht. Der nächste Schritt war wie im Kapitel 2. von Materialien und Methoden beschrieben die Amplifikation mit den optimalen PCR-Thermalprotokollen (s. Materialien und Methoden Tabelle 7, 17, 18, 19 und 20).

3.2.5.1. Sequenzierung des JC- VP1

Die häufigsten VP1- Aminosäure-Positionen, die eine positive Selektion für die PML darstellen und sich im aktiven Zentrum des VP1 befinden, sind: L54, K59, N264, S266, und S268 (s. Kapitel 1.2.6.4., Tabelle 3). Interessanterweise zeigte die Sequenzanalyse der JCV-VP1-Gene in zahlreichen Untersuchungsproben unterschiedlicher Art - vier Liquor-Proben, drei Blutproben und acht Urinproben - ein sehr konserviertes Mutationsmuster, das absolut inkonsistent mit den bereits in der Literatur beschriebenen PML-assoziierten Mutationen ist.

Die nachgewiesenen VP1-AS-Mutationen sind folgende: E69D, N74S, R75K, S117T, T128, L158V, K345R. Es ist wichtig zu erwähnen, dass diese Aminosäure-Mutationen außerhalb des aktiven Bindungszentrums (BC und HI Schleifen/Loops) des VP1-Proteins lokalisiert sind (Tabelle 24, Abb. 22, 23, s. Kapitel 4).

JCV-VP1-MUTATIONEN					
Patient Nr.21 Der klinische Fall mit DOCK8-Defizit				PML-Klinische Fälle u. assoziierte AS- Substitutionen	
LIQUOR	URIN	BLUT	VP1 äußere Schleifen (Loops)	PML - Positive Selektion	VP1 äußere Schleifen (Loops)
E69D	E69D	E69D		L55F	BC
N74S	N74S	N74S	BC	K60M/E/N	
R75K	R75K	R75K			
S117T	S117T	S117T	Alpha-B β- Faltblatt		
T128A	T128A	T128A	DE		
L158V	L158V	L158V			
K345R	K345R	K345R		N265D/ T	HI
	(V268I)			S267F/L	
				S269F/Y/C	

Tabelle 24: Tabellarische Darstellung der nachgewiesenen Mutationen des JCV-VP1-Proteins bei dem Hyper-IgE/ DOCK8-Fall (Patient Nr. 21) im Vergleich zu den bereits beschriebenen PML-assoziierten Mutationen (Huai-Ying, 2005; Maginnis et al., 2013; Neu et al., 2010a; Sunyaev et al., 2009). Eingerahmt sind die bei dem Fall nachgewiesenen VP1-Mutationen, die laut Literatur mit einem günstigen klinischen PML-Verlauf assoziiert sind (Delbue et al., 2009).



Abb. 22: VP1 Monomer Abbildung basierend auf der Struktur des kristallisierten SV40-VP1 (PDB-Kennzeichen:1SVA (Stehle et al., 1996)), modelliert mittels HH-Pred-Software und selbstgezeichnet mit Swiss PDB viewer (s. Kapitel 2.1.7 und 2.2.8). Auf lila, grün und orange werden jeweils die DE-, HI- und BC-Schleifen und ihre dazugehörigen PML- (L55, K60, N265, S267, S269) und Patient-assoziierten (E69, N74, R75, S117, T128, L158, K345) mutierten Aminosäure-Positionen sind in den Kreisen dargestellt.

3.2.5.2. Sequenzierung des JCV-NCCR

Darüber hinaus wurden Sequenzanalysen aus denselben Materialien der Patientin in der NCCR-Generegion durchgeführt. Als Ergebnis fanden sich auch hier nicht PML-typische Mutationen, wie sie in der Literatur beschrieben sind (s. Kapitel 1.2.4.1).

Laut der Definition von Ferenczy und Kollegen ist der JCV-Genotyp des Patienten Nr.21 eine Mischung von Subtypen des Genotyps 1, nämlich eine 1A/1B Genotyp-Mischung. Es fand sich allerdings anstatt der VP1-Mutation Q126A bei dem Stamm die AS-Substitution T128A (s. Kapitel 1.2.6.2., Tabelle 2) (Ferenczy et al., 2012). Laut Agostini und Kollegen gehört der JCV-Stamm der Patientin zum JCV-Genotyp 1B (Genbank Nr. AF281599), wobei er aber die zusätzlichen Mutationen S117 und E69D aufweist (Agostini et al., 2001).

Eine 9bp-Deletion (**e**-Sequenzblock des Archetyps) war in allen Liquor-Proben und in einer einzigen Blut-/Serum-Probe nachweisbar. Dazu wiesen alle untersuchten Proben jeweils zwei kleine Deletionen (2bp von dem **b**- und 19bp von dem **f**- Sequenzblock) auf. Bis auf

diese minimalen Veränderungen und die erste etwas größere Deletion der Genkontrollregion war der JC-Virus-Stamm dem Archetyp – bzw. dem JCV-Wildtyp ähnlich (Sequenz-Alignments in den Abb. 23, 25, 26 und 27). Diese Mutationen entsprechen nicht den am häufigsten beschriebenen PML-NCCR-,*Rearrangements*'. Lediglich findet sich die f-Block-Deletion von 19bp bei den meisten PML-Patienten unter den typischen NCCR-,*Rearrangements*' (s. Abb. 24, 25, 26).



Abb. 23: VP1-Pentamer Abbildung basierend auf der Struktur des kristallisierten pentamerischen VP1 (3NXG (Neu et al., 2010a, 2010b)), modelliert mittels HH-Pred-Software und selbstgezeichnet mit Swiss PDB viewer (s. Kapitel 2.1.7 und 2.2.8). Die jeweiligen Aminosäuren der PML-Mutationen (L55F, K60E/M/N, N265D/T, S267F/L, S269F/Y/C) und die Patient-assoziierten-Mutationen (E69D, N74S, R75K, S117T, T128A, L158V, K345R) sind an dem VP1-Pentamer mit Kreisen gekennzeichnet.

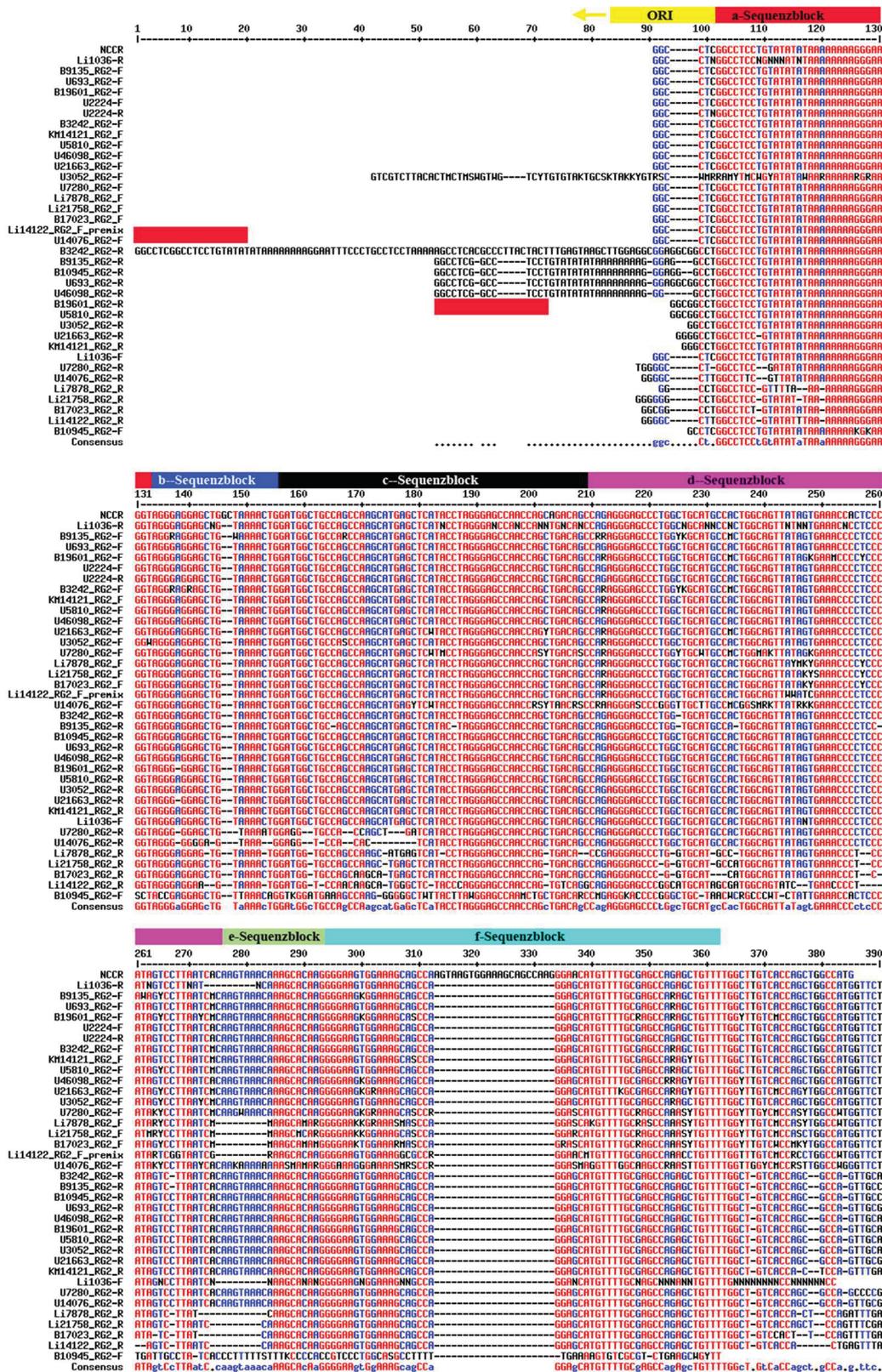


Abb. 24: Das ‚Alignment‘ der NCCR-Sequenzen aller Materialien der Patientin Nr.21. Die gefärbten Boxen oberhalb der Sequenzen entsprechen den Sequenzblöcken des JC-NCCR-Archetyps. **L:** Liquor; **U:** Urin; **B:** Blut/Serum; **KM:** Knochenmark. Der Archetyp und die Sequenzblöcke (A; B; C; D; E; F) sind entsprechend der Literatur (Hansjürgen T. Agostini et al., 1997; Ault, 1997; Gosert et al., 2010; Yogo et al., 1990) gezeichnet. Die zwei konservierten Deletionen in b- und f-Sequenzblock sind als zwei ‚Sequenz-leere Säulen‘ zu sehen, während die Deletion im e-Block nur im Liquor und in einer Blutprobe nachgewiesen wurde.

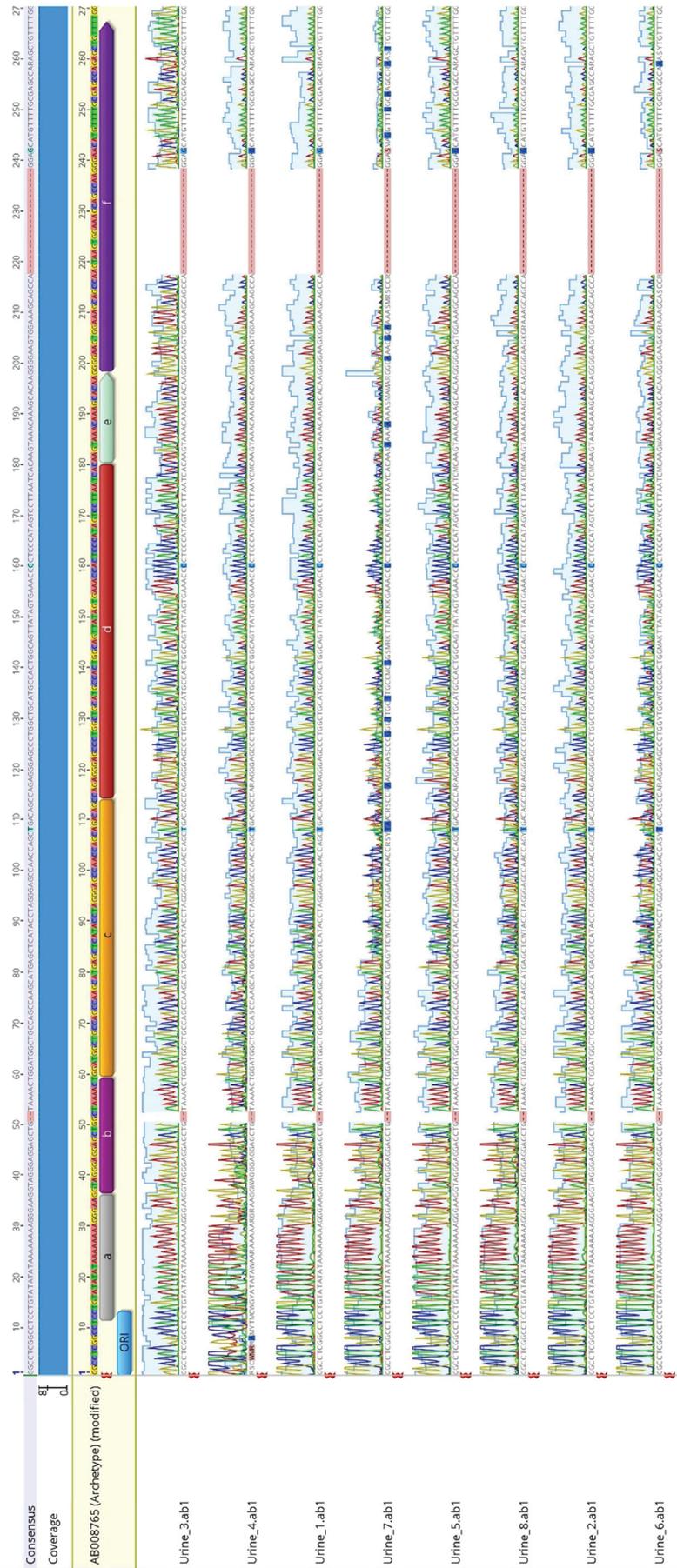


Abb. 25: Alignment der JCV-NCCR-Chromatogramme (Sequenzen) in Urin-Proben der Patientin Nr.21. Die fortlaufende Nummerierung der Proben weist auf jede Urin-Untersuchung in zeitlichem Verlauf hin. Urine: Urin; Consensus coverage: Deckung der Konsensus-Sequenz.

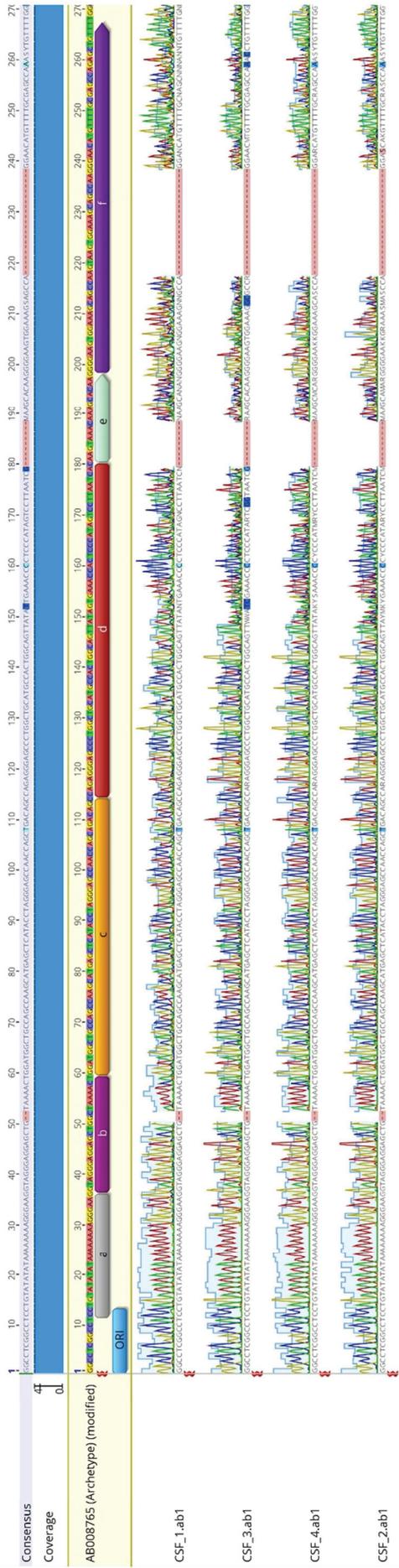
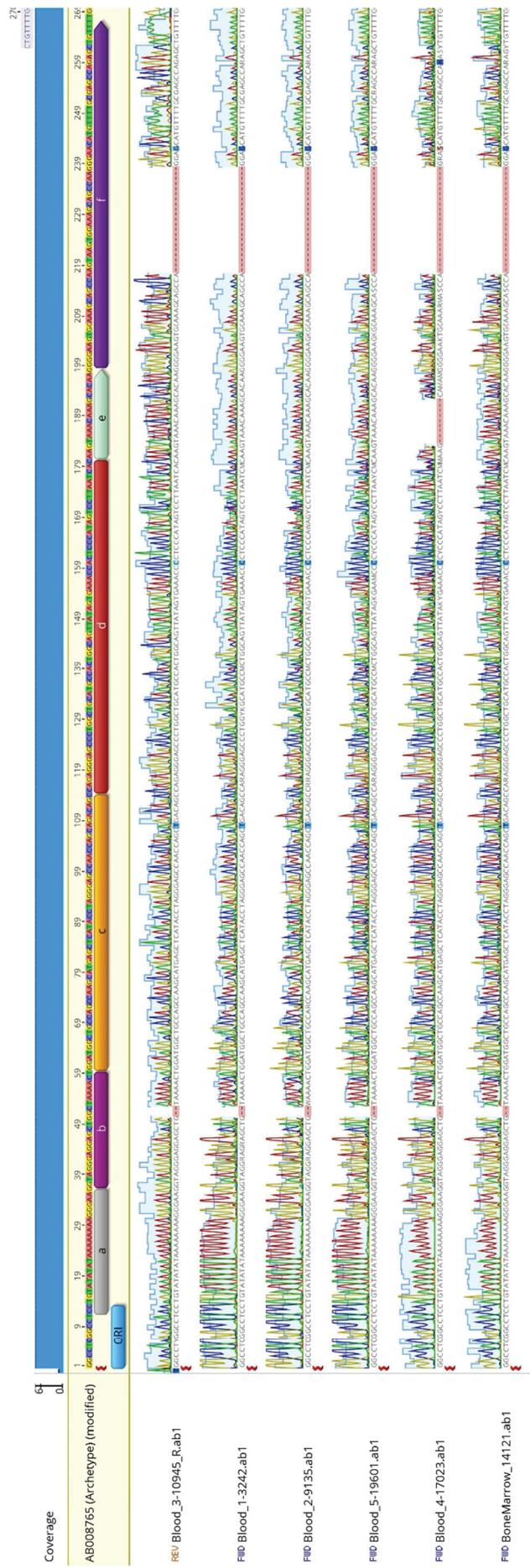


Abb. 26 (OBEN): Alignment der JCV-NCRCR-Chromatogramme (Probe-Sequenzen) in Liquor-Proben der Patientin Nr.21. Die fortlaufende Nummerierung der Proben weist auf jede Liquor-Punktion in zeitlichem Verlauf hin;
Abb. 27 (UNTEN). Alignment der JCV-NCRCR-Chromatogramme (Probe-Sequenzen) in Blut-Proben und Knochenmark (eine Probe) der Patientin Nr.21. Die fortlaufende Nummerierung der Proben weist auf jede Blutabnahme in zeitlichem Verlauf hin. CSF: Liquor; Blood: Serum/Blut; Bone Marrow: Knochenmark;
 Consensus coverage: Deckung der Konsensus-Sequenz.



4. Diskussion

4.1. Die Charakterisierung der PML-Sequenzen

4.1.1. Mutationen im JCV-NCCR

Die NCCR-Region weist –abgesehen vom Sonderfall des Patienten Nr. 21- unabhängig vom Untersuchungsmaterial bei den untersuchten Patienten dieser Studie PML-typische Modifizierungsmuster auf, die sich zudem beim einzelnen Patienten sehr ähnlich oder sogar identisch sind. So sind NCCR-Region zwischen Serum und Liquor intraindividuell meist identisch oder zumindest sehr ähnlich. Jeweils intraindividuell weisen die meisten Patienten (s. Tabelle 23, Patienten Nr. 1, 5, 6, und 15) identische Deletionen im Serum und Liquor auf, während bei anderen Patienten (s. Tabelle 23, Patienten Nr. 3, 4, 8, 16) nur ähnliche Mutationen zwischen denselben Materialien zu verschiedenen Zeitpunkten nachgewiesen wurden. Bis zu einem gewissen Grad gilt dieses Phänomen auch für die Insertionen von Sequenzblöcken der NCCR Region, die offensichtlich einem ständigen Prozess von Duplikationen und anschließenden Teil-Deletionen einzelner Sequenzblöcke unterliegen.

Obwohl sich identische Deletionen bei fast allen Materialien jedes Patienten in dieser Studie als auch in Studien anderer Arbeitsgruppen finden, sind die Insertionen nur zum Teil gleich oder gehören zu benachbarten NCCR-Blockabschnitten bzw. Nukleotidbasen, was mit der Tertiärstruktur der Schleifen („*hairpins*“) der NCCR-DNA-Moleküle zusammenhängen könnte. Trotz der unterschiedlichen Lokalisation der Insertionen in der NCCR-Region bewahren sie meistens dasselbe „*Rearrangement*“-Muster (Johnson et al 2013).

Wie es im Kapitel 4.2.2. ausführlich beim Patienten Nr.21 beschrieben wird, wurden in diesem besonderen Fall identische NCCR-*Rearrangements* im Blut (Serum), Urin und Knochenmark nachgewiesen. Diese Ergebnisse könnten auf eine Erzeugung der NCCR-*Rearrangements* in Orten der Latenz, wie dem Nierenepithel, dem Knochenmark und den Lymphknoten zurückzuführen sein. Allerdings wäre eine zeitgleiche Erscheinung vom identischen NCCR-Muster an unterschiedlichen Latenz-Orten unwahrscheinlich. In der Einleitung dieser Dissertation wurde erwähnt, dass die B-Vorläufer-Zellen trotz ihrer mengenmäßig geringen JCV-Infektion (1 Virus pro 20 Zellen nach Dörries und Kollegen (Dörries et al., 1994) die besten Kandidaten als Ort für die Modifizierung der NCCR Region

sind. Diese Theorie ist glaubhaft und pragmatisch, weil die Maschinerie für die stetige Bildung von neuen Antikörpern im JCV-Genom diese Umordnungen des genetischen Materials verursachen könnte (Johnson et al., 2013; Major et al., 2018). Allerdings gibt es noch weitere Aspekte der NCCR-,*Rearrangements*’, nämlich eine schrittweise Änderung in bestimmter Reihenfolge und vermutlich unterschiedliche Muster in verschiedenen Virus-infizierten Kompartimenten. Diese Theorie wird weiter unten im Zusammenhang mit dem Patienten Nr. 21 näher ausgeführt.

	Keine Sequenzblockwiederholung (S: Singulär)	Mit Sequenzblockwiederholung (R: Repeat)
(I) Keine Insertion von b- bzw. d- Sequenzblock	IS (ORI-a-c-e-f)	IR (ORI- <u>a-c-e</u> - <u>a-c-e</u> - f) bzw. Mad-1, Mad-4
(II) Insertion von b- bzw. d- Sequenzblock (ganz od. Teil)	IIS (ORI -a- b -c-d-e-f) bzw. Archetyp	IIR (ORI- a- <u>b-c-e</u> - <u>b-c-e</u> - f) bzw. Mad-8

Tabelle 25: Kategorisierung der NCCR-Region laut den Merkmalen Sequenzblockwiederholung (S; R) und Insertion von b-,d- Sequenzblock (I; II) (Adaptiert und modifiziert von (Ferenczy et al., 2012; L’Honneur et al., 2018).

Eine interessante Beobachtung unter den analysierten Sequenzen ist die Tatsache, dass die meisten Sequenzen zu der Gruppe IIR-NCCR und darunter zu dem Mad-8 Typ gehören (s. Tabelle 25) (Ferenczy et al., 2012; L’Honneur et al., 2018). Wie weiter unten bei den Sequenzblock-Umordnungstypen in der Tabelle 25 dargestellt (Ferenczy et al., 2012; L’Honneur et al., 2018), ist eine ‚IS‘ NCCR-Sequenz diejenige, die keine Insertion von einem b- bzw. d- Sequenzblock (I) und keine Sequenzblockwiederholung enthält. Eine ‚IR‘-NCCR-Sequenz enthält keine Insertion vom b- bzw. d- Sequenzblock (I), dennoch ist sie durch Sequenzblockwiederholungen charakterisiert (Mad-1, Mad-4). Im Gegensatz dazu enthält eine ‚IIS‘- NCCR-Sequenz eine oder mehrere Insertionen von den b- bzw. d- Sequenzblöcken, zum Teil auch von den b-, d- Sequenzblöcken (I), aber keine Sequenzblockwiederholung

(Archetyp). Als letzte Kategorie schließt eine ‚IIR‘- NCCR-Sequenz eine oder mehrere Insertionen vom ganzen oder von Teilen der b- bzw. d- Sequenzblöcke (I) und gleichzeitig Sequenzblockwiederholung(-en) ein (Mad-8). Laut diesem System wurden bei den 17 Patienten mit NCCR-Sequenzierung und anschließender NCCR-Charakterisierung insgesamt 21 unterschiedlichen NCCR-Typen in dem Probenkollektiv nachgewiesen (s. Tabelle 23) (IIR: 12 Proben, IIS: 5 Proben, IR: 1 Probe, Mad-8: 6 Proben, Archetyp mit Deletionen: 5 Proben, Mad-1, Mad-4: 0 Proben). Diese Ergebnisse entsprechen statistisch bei den **17** auf NCCR-Region untersuchten **Patienten**: IIR: 70,58 %; IIS: 29,41 %; IR: 5,88 %; Mad-8: 36,29 %; Archetyp mit Deletionen: 29,41% bezogen auf die **21** unterschiedlichen **NCCR-Typen der gesamten Patientenproben**: IIR: 57,14%; IIS: 23,81%; IR: 4,76%; Mad-8: 28,57%; Archetyp mit Deletionen: 23,81%. Eine Besonderheit unserer Ergebnisse ist die Abwesenheit des NCCR-Typs ‚Mad-1‘, nämlich des ersten ursprünglich nachgewiesenen PML-Typs (s. Kapitel 1.2.4.1.). Die Dominanz des IIR-NCCR-Umordnungsmuster bei den meisten PML-Patienten scheint hier eindeutig zu sein, während der deletierte Archetyp unter den restlichen Sequenzen und die parallele Existenz derselben Deletionen bei den IIR-Mustern die Theorie stützt, dass zunächst die Deletion einer der zwei identischen nacheinander liegenden Sequenzmotive im f-Block (19-23pb) und nachfolgend die Deletion eines größeren Teils im d-Sequenzblock (\approx 66pb) als erste NCCR- ‚*Rearrangements*‘ bei dem NCCR-Archetyp stattfinden (Johnson et al., 2013).

Die sequentielle Reihenfolge dieser NCCR-Umordnungen wird von Johnson und Kollegen beschrieben und auch hier bestätigt. Die bereits erwähnten Deletionen im d- und f-Sequenzblock finden vor den Duplikationen statt. Die allererste Deletion im f-Sequenzblock ist meistens als Polymorphismus nicht nur bei PML-, sondern auch bei gesunden Individuen wie dem Patienten Nr.21 zu sehen. Dennoch ist in dieser Studie genauso wie in der bereits vorhandenen Literatur (Johnson et al., 2013) eine längere Deletion (\approx 66pb) im d-Sequenzblock bei allen an PML erkrankten Patienten nachzuweisen.

Die Duplikationen mit anschließenden Insertionen der duplizierten NCCR-Stücke, die die NCCR-Sequenz in einen passenden Mad- bzw. PML-Typ kategorisieren, erfolgen später nach den zuvor erwähnten Deletionen. Diese Beobachtung leitet sich daraus ab, dass stets die Deletionen, aber nicht obligatorisch die Duplikationen/Insertionen bei den Patienten dieser Studie zu finden sind. Dieselbe Beobachtung bei dem Patienten Nr.21 spricht für einen nicht-pathologischen Charakter dieser Deletionen und gleichzeitig eine

physiologische Umwandlung der selektierten JCV-Stämme. Vielleicht führen die Deletionen zu einer erhöhten Replikation des Virus, die mit den anschließenden Duplikationen weiter verstärkt wird.

Wie weiter oben erwähnt, sind die Umordnungen der NCCR-Genregion aller JCV-Sequenzen von jedem Patienten dieser Studie zeitlich gesehen bereits bei der ersten Sequenzierung vorhanden. Im zeitlichen Verlauf der Überwachung eines Patienten bleiben sie meistens unverändert oder erscheinen selten leicht differenziert, nicht selten mit Hinweis auf die Existenz von NCCR-Mischpopulationen. Diese Aussage passt zu allen Patienten der Tabelle 23 (s., Kapitel 3) bis auf die folgenden Ausnahmen:

Der Patient Nr. 4, zeigt eine differenzierte Deletion im Sequenzblock d, eine nur im Serum vorhandene Insertion im c- Sequenzblock und eine nur im Liquor vorhandene Insertion im f-Sequenzblock. Alle sind IIR-NCCR-Sequenzen, aber nur eine gehört zu dem Mad-8 Typ. Gleichfalls präsentiert der Patient Nr. 8 eine zusätzliche Deletion im b-Sequenzblock in einer der 2 Liquorproben, während der Patient Nr.16 ein differenziertes NCCR-Muster zwischen Serum (IIS) und Liquor (IIR) mit keinem eindeutigen Mad-Typ aufweist. Der Patient Nr.3 weist im Großen und Ganzen ein konsistentes NCCR-Umordnungsmuster auf, das allerdings minimale Unterschiede bei den Nukleotidbasen in zwei Sequenzen im Liquor und einer Sequenz im Serum aufweist. Alle Sequenzen gehören zu dem Typ IIR, aber nur eine kann als Mad-8 identifiziert werden. Im Liquor und Serum sind ähnliche Deletionen von leicht unterschiedlicher Länge bei den Sequenzblöcken b-c, d- und f zu sehen. Allerdings finden sich im Serum 2 zusätzliche Deletionen in den f- und e- Sequenzblöcken, die im Liquor nicht nachweisbar sind, während die Insertion im d-Block unterschiedliche duplizierte NCCR-Sequenzabschnitten enthält. Die oben genannten Patienten stellen Ausnahmen dar, denn alle anderen Patienten zeigen stark konservierte NCCR-Sequenzen in allen untersuchten Materialien und während des zeitlichen Verlaufs.

Das beschriebene Phänomen der Dominanz eines NCCR-Typs bei Proben und Materialien eines Patienten im Laufe der Zeit als auch die Tatsache, dass bei den Patienten Nr.3, 4, 8 und 16 die neuen NCCR-Umordnungen zuerst im Serum (Blut) auftauchen, stützt vor allem die Theorie der *NCCR-Rearrangement* durch die Maschinerie in den B-Vorläuferzellen. Ein widersprüchliches Sequenzierungs-Ergebnis ist bei dem Patienten Nr. 21 zu finden: er weist zusammen mit seiner typischen f-Block-Deletion und der 2 Basen-b-Block-Deletion eine weitere Deletion im e-Block auf. Die Besonderheit dieser Deletion liegt in ihrer Existenz bei

allen Liquorproben und nur in einer Serumprobe. In den restlichen Serumproben, im Knochenmark, als auch in allen Urin-Proben existiert diese Deletion nicht, was einen Widerspruch zu der NCCR-Umordnungstheorie stellen könnte. Dieses Phänomen könnte eine natürliche Selektion einer NCCR-Genotyp-Variante im Sinne der JCV-Evolution aus einer viralen IIS-Typ-Mischpopulation sein, die im Liquor-Raum des Patienten stattgefunden hat, wo die JCV-Replikation wie beschrieben äußerst hoch im Vergleich zu der Peripherie war. Eine weitere Erklärung könnte die Existenz eines zusätzlichen Raums sein, z.B. im Endothelium, wo sich das Virus nach Infektion der Zellen aufhalten, genetisch verändern und direkten Kontakt mit dem Liquor bewahren kann. Diese Argumentation wird weiter unten im Zusammenhang mit der VP1-molekulare Analyse bei allen Patienten fortgeführt (s. Kapitel 4.2).

4.1.2. Mutationen im JCV-VP1

Im Gegenteil zu der NCCR-Region unterliegt das VP1-Gen im PML-Patienten einem ständigen Mutationsprozess in Abhängigkeit von der Viruslast. In diesem Genbereich kann man kein spezifisches Änderungsmuster definieren, nur gut charakterisierte Aminosäure-Substitutionen, die bei den PML-Fällen eine starke und konsistente Häufigkeit aufweisen. Die 3 häufigsten Mutationen, die zu einem veränderten Zelltropismus und der Pathogenese der PML beitragen, sind laut Literatur die Mutationen L55F, S267F und S269F (Gorelik et al., 2011; Maginnis et al., 2013). Zusätzlich sind laut Maginnis und Kollegen die AS-Substitutionen S267F und S269Y weniger häufig zu sehen, allerdings sind sie ebenso als PML-assoziiert beschrieben. PML-assoziiert sind gleichfalls die AS-Substitutionen K60N und D66H. Laut Gorelik und Kollegen bewahrt die AS-Stelle D66H die Affinität zu sialylierten Molekülen mit einer eher veränderten Spezifität, während die mutierte AS-Stelle 265D eine neue Bindungseigenschaft zu nicht-sialyliertem GM1 erzeugt.

Eine ähnliche Umwandlung der Rezeptor-Spezifität weist auch der Genotyp 3 auf, indem er sich mit nur einer reduzierten Affinität zu Nierenzellen, Erythrozyten und Lymphozyten präsentiert. Allerdings behält der bestimmte Genotyp die Fähigkeit, an Gliazellen und Astrozyten zu binden und wird aus diesem Grund als kein echter PML-Typ klassifiziert (Gorelik et al., 2011; Maginnis et al., 2013). Dies ist aber für die Patienten der vorliegenden Studie nicht von Belang, da die meisten Patienten eine PML-Modifizierung des Genotyps-

1A aufweisen (laut der Tabelle 2, Kapitel 1.2.6.2.) (Ferenczy et al., 2012). Vier Patienten (Patienten Nr. 6, 9, 11, 21) haben einen gemischten 1A/1B Genotyp mit einem Zusatz von PML-spezifischen und PML-irrelevanten Substitutionen (Patient Nr.21). Genotyp 3 findet sich in unsere Studie nicht.

PML-assoziierte AS-Substitution (Literatur)	VP1-Sequenzen		Patienten untersucht auf VP1	
	(Anzahl Sequenzen, Prozentsatz %)		(Anzahl Patienten, Prozentsatz %)	
	49	100%	19	100%
<i>L55F</i>	2	4,08%	2	10,53%
<i>K60N</i>	4	8,16%	3	15,79%
<i>D66H</i>	1	2,04%	1	5,26%
<i>S265D/H/Q/S</i>	5	10,2%	4	21,05%
<i>S267F</i>	2	4,08%	2	10,53%
<i>S269F</i>	5	10,2%	3	15,79%
<i>S269Y</i>	6	12,24%	4	21,05%
<i>S269 F/C/Y</i>	13	26,53%	8	42,11%
<i>(*) IA Genotyp, Konsensus, bzw. Nicht-PML-Typ</i>	7	14,29%	6	31,58%
<i>(*) Nicht-PML- Typ (inkl. Nr.21)</i>	22	44,9%	7	36,84%

Tabelle 26: Aufgeführt sind die häufigsten, PML-assoziierten AS-Substitutionen laut der Literatur in der linken Spalte (Gorelik et al., 2011), die bei den Patienten und Sequenzen dieser Studie auch einzeln vorkommen. (*): VP1-Typen dieser Arbeit.

Bei den Patienten unserer Studie lässt sich eine Dominanz der S269 F/C/Y Substitutionen beobachten, während die Stelle L55 nur zweimal mutiert vorkommt (4,08% der

Sequenzen). Entgegen der Erwartung erscheint die Substitution S269Y (21,05%) häufiger als die S269F (15,79%) unter den untersuchten Patienten. Überraschenderweise sind bei 6 PML-Patienten eine oder mehrere Wildtyp- (Archetyp) Sequenzen während ihres Verlaufs nachzuweisen (s. Tabelle 26). Diese umschließen Liquorproben als auch die Hirnbiospie eines schwer an PML erkrankten Individuums (Patient Nr.14), während man die parallele Existenz von unterschiedlichen PML-Mutationen in Serum und Liquor als eine ständige Bewegung, als Mutierungs-Prozess und als Selektion von Stämmen mit Replikationsvorteilen zu bestimmten Zeitpunkten interpretieren kann.

Die erwähnten PML-spezifischen AS-Substitutionen kommen in der aktuellen Studie beim einzelnen PML-Patienten genauso wie in der Literatur beschrieben allein und nie in Kombination miteinander vor (Gorelik et al., 2011; Maginnis et al., 2013). Die VP1-PML-Mutanten, die diese AS-Substitutionen aufweisen, verlieren ihre Bindungseigenschaft an die LSTc-Moleküle/sialylierte Glycan-Motive und somit an die Zielzellen der Peripherie und sind daher laut Maginnis und Kollegen für diese Ziellinien auch wenn sie bei PML-Patienten nachgewiesen werden. Es ist anzunehmen, dass der Verlust der Sialinsäure-Bindung für eine effektivere Ausbreitung im Gehirn mit anschließender Infektion von Gliazellen in Sialinsäure-unabhängigen Weise notwendig sein könnte. Es ist denkbar, dass sie sich durch Ihre verlorene LSTc-Zellbindungseigenschaft besser über die Zirkulation im ganzen Körper ausbreiten und durch die Blut-Hirnschranke ins Gehirn eintreten und an nicht-sialylierten Glycosaminoglykane (GAGs) binden könnten (Magginis 2013). Laut Gorelik und Kollegen verlieren die JCV-Stämme mit PML-spezifischen Mutationen ihre Hämagglutinations- und Bindungs-Eigenschaft an Nierenzellen und Lymphozyten, aber nicht an Hirnzellen. Dieses Phänomen trägt noch weiter zu der Verbreitung des Virus im Gehirn bei.

4.2. Der Fall des Patienten Nr.21

4.2.1. JC-Virus und PML in Zusammenhang mit Hyper-IgE-Syndrom

Im Fall der Patientin Nr.21 waren eine HIV1/2-Infektion, als auch Therapien mit immunmodulatorischen Medikamenten ausgeschlossen.

In den letzten Jahren erschienen vereinzelte Berichte über PML-Fälle, die einen Immundefekt mit genetischem Hintergrund z.B. dem DiGeorge-Syndrom aufwiesen und in einigen Fällen auch mit einer DOCK-8-Defizienz. Konkret sind bereits 2 PML-Fälle bei Dock-

8 Defizienz (Autosomal-Rezessives Hyper-IgE-Syndrom, Typ 2) beschrieben. Der erste Fall litt - in ähnlicher Weise wie der beschriebene Fall - an einem Burkitt-Lymphom und der zweite Fall an einer begleitenden autoimmun-hämolytischen Anämie (Aydin et al., 2015; Engelhardt et al., 2009). Beide Patienten wiesen einen JCV-Nachweis im Liquor auf. Im Gegensatz zu der von uns beschriebenen Patientin litten sie klinisch tatsächlich an einer PML.

4.2.2. Patient Nr.21 im Vergleich zu den Fällen mit manifester PML

Über die gesamte Beobachtungszeit wies der Patient Nr.21 außerordentlich hohe JC-Viruslasten in allen eingesandten Materialien (Blut, Serum, Liquor, Urin, Knochenmark) inklusive besonderer Materialien wie Rachenabstriche und Ohrabstriche auf, die allerdings nicht alle in dieser Studie eingeschlossen und sequenziert werden konnten (Ghosh et al., 2014). Die hochaktive JCV-Replikation und die Ausscheidung in allen Materialien sind offensichtlich. Dennoch ist der Patient trotz des exorbitant hohen JCV-Nachweises nie an einer PML erkrankt. Von besonderem Interesse ist dabei das Phänomen der gleichzeitig parallelen hohen Viruslast des Polyomavirus BKV in allen Materialien des Patienten mit Ausnahme der Liquorproben. Das spricht bezüglich des JCV gegen einen passiven Virusübertritt in das ZNS bzw. gegen eine defekte Blut-Liquor-Schranke, weil in einer solchen Situation ein ebenso hoher BKV-Nachweis im Liquor zu erwarten gewesen wäre. Das JCV hat gegenüber dem BKV offensichtlich einen besonderen Virus-spezifischen Mechanismus für seinen Eintritt entweder durch die Bluthirnschranke oder durch die Blut-Liquorschranke ins Gehirn entwickelt. Weder das dem JCV am nächsten verwandte Polyomavirus BK, das in der Peripherie sich ebenso massiv replizierte und in Massen ausgeschieden wurde, noch ein anderes Virus oder Bakterium waren zu irgendeinem Zeitpunkt im Liquor nachweisbar.

Dieses Phänomen stellt die allgemein angenommene hohe Spezifität des JCV-DNA Nachweises für das Vorliegen einer PML in Frage. Im Allgemeinen reicht bei passender Klinik und auffällige MRT der JCV-Nachweis für die Sicherung der Diagnosestellung einer PML. Der Patient Nr.21, ein pädiatrischer, hämatologischer Patient mit einem auch bei PML Patienten außerordentlichen JCV-Nachweis im Liquor, hatte eine

Stammzellentransplantation hinter sich und zeigte niemals im Verlauf Zeichen einer Enzephalitis.

Wie bereits in dem Kapitel 3.2 erwähnt wurde, war bei dem Patienten Nr.21 ein seltener Immundefekt, nämlich ein Hyper-IgE-Syndrom, mit einem Dock-8-Defizit diagnostiziert, das zu einer Senkung der CD8⁺- und vorwiegend der CD4⁺-Zellzahl, einer verminderten CD4⁺-CD8⁺-Zellen-Aktivierung und eindeutiger Veränderung der CD4⁺/CD8⁺-Zellzahl-Ratio führt. Bei HIV- und bei mit immunmodulatorischen Therapien behandelten Patienten ist nach immunhistochemischer Färbung der Hirnbiopsien eine niedrigere CD4⁺-Zahl in den zerebralen perivaskulären Räumen (Endothelia) und eine niedrigere CD4⁺/CD8⁺-Zellzahl-Ratio im Blut und im Liquor zu beobachten (del Pilar Martin et al., 2008; M. C. G. Monaco and Major, 2015; Stuve et al., 2006). Diese Beobachtung deutet auf einen wichtigen Risikofaktor, nämlich eine Aufhebung der Abwehr von Viren in diesem Kompartiment hin. Es könnte einen möglichen Eintritt-Mechanismus des Virus in den Liquorraum der immunsupprimierten Individuen begünstigen. Eine Infektion der Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke könnte auch bei diesem Fall angenommen werden.

Der Patient Nr.21 hat nie ein neurologisches Defizit entwickelt und aus diesem Grund wurde nie eine Hirnbiopsie vorgenommen. Sein guter neurologischer Zustand legt nahe, dass keine Virus-Invasion des Hirn-Parenchyms, sondern eine massive Proliferation des JCV ausschließlich im Liquorraum stattgefunden hat.

Bei den Proben des Patienten Nr.21 blieb über die Zeit die NCCR-Region unverändert, unabhängig von der Viruslasthöhe (s. Abb. 25, 26, 27, Kapitel 3.2). Wie weiter oben im Detail aufgeführt wurde, wies der Patient zusammen mit der häufig zu findenden f-Block-Deletion und der 2 Basen-b-Block-Deletion eine weitere Deletion im e-Block auf. Die Besonderheit dieser Deletion liegt in ihrem Nachweis nur bei den Liquorproben und in einer einzigen Serumprobe. Die übrigen Materialien, darunter Serum-, Knochenmark- und Urin-Proben weisen diese Deletion nicht auf. Dieses Phänomen deutet auf eine Selektion eines NCCR-Genotyps in Sinne der JCV-Evolution hin: das Virus könnte sich unter einer viralen IIS-Typ-Mischpopulation befunden haben und unter der hohen JCV-Replikation in den Liquorräumen des Patienten selektiert worden sein. Alternativ könnte es einen zusätzlichen Raum dafür geben, z.B. im Endothelium, wo sich das Virus nach der Infektion aufhält, ändert und in einen direkten Kontakt zum Liquor treten kann.



Abb. 28: VP1 Monomer Abbildung basierend auf der Struktur des kristallisierten SV40-VP1 (PDB-Kennzeichen:1SVA (Stehle et al., 1996)), modelliert mittels HH-Pred-Software und selbstgezeichnet mit Swiss PDB viewer (s. Kapitel 2.1.7 und 2.2.8). Die PML-assoziierten AS-Substitutionen (L55F, K60E/M/N, N265D/T, S267F/L, S269F/Y/C) in orange und die AS-Substitutionen einer PML mit guter Prognose beim Patienten Nr.21 (E69D, N74S, R75K, S117T, T128A, L158V, K345R) in grün werden hier dargestellt. In lila, grün und orange werden jeweils die DE-, HI- und BC- Schleifen entsprechend dargestellt.

Im Gegensatz zu der Konstanz der NCCR-Region verändert sich bei einigen Patienten das VP1-Gen während des zeitlichen Verlaufs. Ein repräsentatives Beispiel dafür ist der PML-Patient Nr.1: bei einer JCV-Viruslast von 17.158.322 K/ml erschien eine PML-spezifische AS-Substitution (S269C). Interessanterweise ist vor dem steilen Anstieg als auch in der Phase des Viruslast-Abfalls der Archetyp nachzuweisen, der stets von der R75K Substitution begleitet wird (Patient Nr.1). Diese Beobachtung könnte auf einen offensichtlichen Vorteil bei der Selektion des VP1-Wildtyps bei den niedrigen Viruslasten, nämlich bei einem kompetitiven Immunsystem hindeuten, als ob die VP1-Mutanten nur unter bestimmten Immunsuppressions-Umständen erscheinen könnten.

Im Allgemeinen sind die spezifischen Gen-Mutationen der VP1-Kapsid-Genregion des JC-Virus mit einer Minderung der Affinität des Virus für den Sialin-Säure-zellulären Rezeptor der Oligodendrozyten und weiterhin mit einer Pathogenität der PML unter

Immunsupprimierten Individuen assoziiert. Die Sequenzanalyse des JCV-VP1-Genes vom Patienten Nr.21 zeigte keinen PML JC-VP1-Typ, da keine PML-assoziierten Mutationen (L55, K60, N265, S267, und S269) nachgewiesen wurden (Gorelik et al., 2011; Neu et al., 2010a; Sunyaev et al., 2009). Die nachgewiesenen Mutationen beim JC-Virus-Stamm des Patienten Nr.21 sind die: E69D, N74S, R75K, S117T, T128, L158V, K345R (s. Abb. 28 und 29, Kapitel 4.2 und Tabelle 24, Kapitel 3.2.6.2.). Es ist wichtig zu erwähnen, dass diese Aminosäurestellen außerhalb des aktiven Bindungszentrums (BC und HI Schleifen/Loops) des VP1-Proteins lokalisiert sind und keinen direkten Kontakt zu den (LSTc) sialylierten Glykanen haben.

Die vier Aminosäure-Positionen, nämlich R75, S117, L158 in der Nähe der VP1-Bindetasche und K345 befinden sich am C-Terminus des Proteins (Gorelik et al., 2011; Maginnis et al., 2013). Interessant ist die Tatsache, dass Mutationen an den AS-Positionen 74,75,117,128 mit einer ‚günstigeren‘ PML Prognose in der Literatur assoziiert sind (Delbue et al., 2009). Eine Hypothese hierbei könnte sein, dass der Patient keine PML entwickelt hat, jedoch vorübergehend an JCV-Meningitis litt, d.h. an einer Entzündung der Meningen und nicht des Hirn-Parenchyms (Enzephalitis-PML). Diese müsste sich allerdings folgenlos nach seinem kritischen Zustand nach der Transplantation und während der Immunrekonstitution zurückgebildet haben.

Es ist in der Tabelle 22 im zeitlichen Verlauf aller Patienten zu erkennen, dass die charakteristischen PML-assoziierten AS-Substitutionen des aktiven VP1-Zentrums, das Virus in einem Hirn-Parenchym-invasiv-fähigen Stamm umwandeln. Da solche AS-Substitutionen nie bei dem Patienten Nr.21 nachzuweisen waren, fehlten bei ihm die Voraussetzungen zur Entwicklung einer PML. Zu der Frage, ob die Mutationen im aktiven Zentrum für den lytischen Zyklus des JCV in Oligodendrozyten oder auch schon zuvor für das Eintreten des Virus in den Liquorraum verantwortlich sind, unterstützt der Fall des Patienten Nr. 21 nur den ersten Aspekt (s. Abb. 29).

Eine andere Erklärung könnte sein, dass zusätzlich zu der CD4+/CD8+ Ratio-Minderung in den zerebralen perivaskulären Räumen (Endothelien) aufgrund des Dock-8-Defizits, keine Störung der Blut-Hirn-Schranke beim Patienten Nr.21 vorlag, sondern eine Replikation im Plexus Choroideus stattgefunden hat, wo das Virus unattackiert von den Lymphozyten im Endothelium bleibt und in dem Fall über die Blut-Liquor-Schranke und nicht über die Blut-Hirn-Schranke tritt und proliferieren kann. Das könnte ein Mechanismus bei der frühen

Phase der Reaktivierung des JCV sein, während der noch keine PML-assoziierten AS-Substitutionen im aktiven Zentrum des VP1, sondern nur die für die erhöhte Replikation wichtigen ‚NCCR-Rearrangements‘ (Deletionen und nachhinein die Duplikationen-Insertionen) erfolgen.

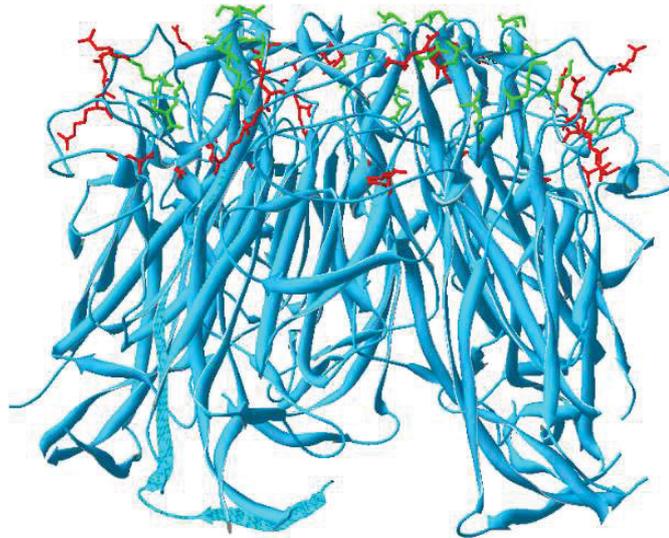


Abb. 29: VP1-Pentamer Abbildung basierend auf der Struktur des kristallisierten pentamerischen VP1 (3n_xg (Neu et al., 2010a, 2010b)) modelliert mittels HH-Pred-Software und selbstgezeichnet mit Swiss PDB viewer (Siehe Kapitel 2.1.7 und 2.2.8). Die PML-assoziierten AS-Substitutionen im aktiven Zentrum (in grün: L55F, K60E/M/N, N265D/T, S267F/L, S269F/Y/C) und die AS-Substitutionen von Patienten Nr.21 (in rot: E69D, N74S, R75K, S117T, T128A, L158V, K345R) werden an derselben (hier an der obersten) Oberfläche dargestellt und somit wird die Nähe aller AS-Stellen deutlich.

Die Tatsache, dass bei dem Patienten Mycophenolatmofetil als GvHD-Prophylaxe seit dem Tag -1 vor der Tx verabreicht wurde, könnte zu der phänomenalen Proliferation des JCV in allen Körper-Kompartimenten des Patienten beitragen. Wie bereits im Kapitel 1.6.2. beschrieben ist das Immunsuppressivum mit PML assoziiert (Berger, 2010; Zaheer and Berger, 2012), indem es unter anderen eine T-Zellen-Depletion verursacht. Auf diese Weise bleibt und proliferiert das Virus ebenso unattackiert von den Lymphozyten in seinen Latenzseiten und in der Peripherie.

Eine weitere Spekulation ist ein potentieller Einfluss der mehrmaligen Heparin-Gaben auf das Geschehen. Es ist bekannt, dass ein Wild-Typ-Virus beide Zellrezeptor-Alternativen nutzen kann, vor allem die sialylierten Glykane (LSTc), aber auch die nicht-sialylierten Glycosaminoglykane (GAGs), die den Hauptzellrezeptor der JCV-PML-Mutanten vertreten (Geoghegan et al., 2017; Gorelik et al., 2011; Maginnis et al., 2013). Das Heparin ist ein freies und lösliches GAG, das als Antikoagulans genutzt wird. Es ist gezeigt worden (Geoghegan et al., 2017), dass es antagonistisch zu den zellulären, nicht-sialylierten Glycosaminoglykanen (GAGs) wirken kann (s. Kapitel 1.2.5.1.). Die Gaben des Patienten Nr.21 hätten demzufolge antagonistisch auf die Selektion von aufgetretenen pathogenen PML-assoziierten Mutanten gewirkt, die nur die nicht-sialylierten Glycosaminoglykane (GAGs) als Rezeptor nutzen können. Wir konnten allerdings in keiner Probe des Patienten die beschriebenen Virusmutanten finden, auch nicht als Minorpopulation.

Folgende Fragen bleiben offen:

Laut unserer Beobachtungen sind die Mutationen im aktiven Zentrum zuständig für eine Pathogenitätsumwandlung hin zu einem Oligodendrozyten-lytischen Virus. Es ist nicht bekannt, ob diese Mutationen auch nötig sind, damit das Virus in den Liquorraum eintreten kann?

Gibt es einen noch nicht definierten Raum wo sich das Virus latent in der Nähe von dem Hirn-Parenchym replizieren und gegebenenfalls von dort später ins Gehirn eintreten und letztendlich eine PML hervorrufen kann?

Spielen dazu die NCCR-*‘Rearrangements’* und die Viruslast-Höhe eine Rolle? Gibt es tatsächlich eine *‘Mutanten’*-Selektion unter der Immunsuppression? Ist der Archetyp der Stamm mit Selektionsvorteil bei den Immunkompetenten Individuen?

Mittels genetischer Manipulation (wie z.B in vitro-Mutagenese) könnten die interessanten Mutationen des nicht-PML Patienten erneut in wild-Typ-JCV bzw. wild-Typ-VLPs erzeugt werden und nach anschließender Inokulation von passenden Zellkulturen wichtige Punkte der Biologie, des Zellzyklus, der Persistenz- und VP1-Erstmutations-Orten erforschen.

Die Beantwortung dieser Fragen könnte weiter dazu beitragen, die Pathogenese der PML aufzuklären und damit möglicherweise Ansatzpunkte zur Verhinderung dieser fatalen neurologischen Komplikation unter den immunmodulatorischen Therapieansätzen liefern.

5. Literatur

- Agilent, T., 2012. Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix, 600828-12.
- Agilent Technologies Inc., 2013. Herculase II Fusion DNA Polymerase 1–2.
- Agostini, H.T., Brubaker, G.R., Shao, J., Levin, A., Ryschkewitsch, C.F., Blattner, W.A., Stoner, G.L., 1995. BK virus and a new type of JC virus excreted by HIV-1 positive patients in rural Tanzania. *Arch. Virol.* 140, 1919–1934. <https://doi.org/10.1007/BF01322682>
- Agostini, H.T., Deckhut, A., Jobes, D. V., Girones, R., Schlunck, G., Prost, M.G., Frias, C., Pérez-Trallero, E., Ryschkewitsch, C.F., Stoner, G.L., 2001. Genotypes of JC virus in East, Central and Southwest Europe. *J. Gen. Virol.* 82, 1221–1331. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-5-1221>
- Agostini, H.T., Ryschkewitsch, C.F., Baumhefner, R.W., Tourtellotte, W.W., Singer, E.J., Komoly, S., Stoner, G.L., 2000. Influence of JC virus coding region genotype on risk of multiple sclerosis and progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neurovirol* 6, 101–108.
- Agostini, H. T., Ryschkewitsch, C.F., Brubaker, G.R., Shao, J., Stoner, G.L., 1997. Five complete genomes of JC virus type 3 from Africans and African Americans. *Arch. Virol.* 142, 637–655. <https://doi.org/10.1007/s007050050108>
- Agostini, Hansjürgen T., Ryschkewitsch, C.F., Singer, E.J., Stoner, G.L., 1997. JC virus regulatory region rearrangements and genotypes in progressive multifocal leukoencephalopathy: Two independent aspects of virus variation. *J. Gen. Virol.* 78, 659–664. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-3-659>
- Allander, T., Andreasson, K., Gupta, S., Bjerkner, A., Bogdanovic, G., Persson, M.A.A., Dalianis, T., Ramqvist, T., Andersson, B., 2007. Identification of a third human polyomavirus. *J. Virol.* 81, 4130–4136. <https://doi.org/10.1128/JVI.00028-07>
- Antinori, A., Cingolani, A., Lorenzini, P., Giancola, M.L., Uccella, I., Bossolasco, S., Grisetti, S., Moretti, F., Vigo, B., Bongiovanni, M., Del Grosso, B., Arcidiacono, M.I., Fibbia, G.C., Mena, M., Finazzi, M.G., Guaraldi, G., Ammassari, A., Monforte, A. d’Arminio, Cinque, P., De Luca, A., 2003. Clinical Epidemiology and Survival of Progressive Multifocal Leukoencephalopathy in the Era of Highly Active Antiretroviral Therapy: Data from the Italian Registry Investigative Neuro AIDS (IRINA). *J. Neurovirol.* 9, 47–53. <https://doi.org/10.1080/13550280390195388>
- AppliChem, 2009. Agarose-Gel-Elektrophorese. AppliChem, Deutschland.
- Arthur, R.R., Beckmann, A.M., Li, C.C., Saral, R., Shah, K. V., 1985. Direct detection of the human papovavirus BK in urine of bone marrow transplant recipients: Comparison of DNA hybridization with ELISA. *J. Med. Virol.* 16, 29–36. <https://doi.org/10.1002/jmv.1890160105>
- Arthur, R.R., Shah, K. V., Charache, P., Saral, R., 1988. BK and JC virus infections in recipients of bone marrow transplants. *J Infect Dis* 158, 563–569.
- Assetta, B., Atwood, W.J., 2017. The biology of JC polyomavirus. *Biol Chem* 398, 839–855.

<https://doi.org/10.1515/hsz-2016-0345>

- Aström, KE; Mancall, EL; Richardson, E.J. et al., 1958. Progressive multifocal leukoencephalopathy; a hitherto unrecognized complication of chronic lymphatic leukaemia and Hodgkin's disease. *Brain*. 81, 93–111.
- Ault, G.S., 1997. Activity of JC virus archetype and PML-type regulatory regions in glial cells. *J. Gen. Virol.* 78, 163–169. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-1-163>
- Ault, G.S., Stoner, G.L., 1992. Two major types of JC virus defined in progressive multifocal leukoencephalopathy brain by early and late coding region DNA sequences. *J. Gen. Virol.* 73, 2669–2678. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-73-10-2669>
- Aydin, S.E., Kilic, S.S., Aytekin, C., Kumar, A., Porras, O., Kainulainen, L., Kostyuchenko, L., Genel, F., Kutukculer, N., Karaca, N., Gonzalez-Granado, L., Abbott, J., Al-Zahrani, D., Rezaei, N., Baz, Z., Thiel, J., Ehl, S., Marodi, L., Orange, J.S., Sawalle-Belohradsky, J., Keles, S., Holland, S.M., Sanal, O., Ayvaz, D.C., Tezcan, I., Al-Mousa, H., Alsum, Z., Hawwari, A., Metin, A., Matthes-Martin, S., Honig, M., Schulz, A., Picard, C., Barlogis, V., Gennery, A., Ifversen, M., van Montfrans, J., Kuijpers, T., Bredius, R., Duckers, G., Al-Herz, W., Pai, S.Y., Geha, R., Notheis, G., Schwarze, C.P., Tavil, B., Azik, F., Bienemann, K., Grimbacher, B., Heinz, V., Gaspar, H.B., Aydin, R., Hagl, B., Gathmann, B., Belohradsky, B.H., Ochs, H.D., Chatila, T., Renner, E.D., Su, H., Freeman, A.F., Engelhardt, K., Albert, M.H., inborn errors working party of, E., 2015. DOCK8 deficiency: clinical and immunological phenotype and treatment options - a review of 136 patients. *J Clin Immunol* 35, 189–198. <https://doi.org/10.1007/s10875-014-0126-0>
- Baer, A., Colon-Moran, W., Bhattarai, N., 2018. Characterization of the effects of immunomodulatory drug fingolimod (FTY720) on human T cell receptor signaling pathways. *Sci Rep.* 8, 10910.
- Baker, T.S., Drak, J., Bina, M., 1989. The capsid of small papova viruses contains 72 pentameric capsomeres: direct evidence from cryo-electron-microscopy of simian virus 40. *Biophys. J.* 55, 243–253. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(89\)82799-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(89)82799-7)
- Bayliss, J., Karasoulos, T., McLean, C.A., 2012. Frequency and large T (LT) sequence of JC polyomavirus DNA in oligodendrocytes, astrocytes and granular cells in non-PML brain. *Brain Pathol.* 22, 329–336. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2011.00538.x>
- Berger, J.R., 2014. Progressive multifocal leukoencephalopathy. *Handb. Clin. Neurol.* 123, 357–376. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53488-0.00017-1>
- Berger, J.R., 2011. The clinical features of PML. *Cleve. Clin. J. Med.* 78, s8-12. <https://doi.org/10.3949/ccjm.78.s2.03>
- Berger, J.R., 2010. Progressive multifocal leukoencephalopathy and newer biological agents. *Drug Saf.* 33, 969–983. <https://doi.org/10.2165/11537510-000000000-00000>
- Berger, J.R., Aksamit, A.J., Clifford, D.B., Davis, L., Koralnik, I.J., Sejvar, J.J., Bartt, R., Major, E.O., Nath, A., 2013. PML diagnostic criteria: Consensus statement from the AAN neuroinfectious disease section. *Neurology* 80, 1430–1438. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31828c2fa1>
- Berger, J.R., Cree, B.A., Greenberg, B., Hemmer, B., Ward, B.J., Dong, V.M., Merschhemke,

- M., 2018. Progressive multifocal leukoencephalopathy after fingolimod treatment. *Neurology* 90, e1815 e1821.
- Berger, J.R., Kaszovitz, B., Donovan, M.J., Dickinson, G., 1987. Progressive Multifocal Leukoencephalopathy Associated with Human Immunodeficiency Virus Infection: A Review of the Literature with a Report of Sixteen Cases. *Ann. Intern. Med.* 107, 78–87.
- Berger, J.R., Miller, C.S., Danaher, R.J., Doyle, K., Simon, K.J., Norton, E., Gorelik, L., Cahir-McFarland, E., Singhal, D., Hack, N., Owens, J.R., Nelson, P.T., Neltner, J.H., 2017. Distribution and quantity of sites of John Cunningham virus persistence in immunologically healthy patients: Correlation with John Cunningham virus antibody and urine John Cunningham virus DNA. *JAMA Neurol.* 74, 437–444. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2016.5537>
- Berger, J.R., Pall, L., Lanska, D., Whiteman, M., 1998. Progressive multifocal leukoencephalopathy in patients with HIV infection. *J. Neurovirol.* 4, 59–68. <https://doi.org/10.3109/13550289809113482>
- Berger, T., Elovaara, I., Fredrikson, S., McGuigan, C., Muiola, L., Myhr, K.M., Oreja-Guevara, C., Stoliarov, I., Zettl, U.K., 2017. Alemtuzumab Use in Clinical Practice: Recommendations from European Multiple Sclerosis Experts. *CNS Drugs* 31, 33–50. <https://doi.org/10.1007/s40263-016-0394-8>
- Bhattacharjee, S., Chattaraj, S., 2017. Entry, infection, replication, and egress of human polyomaviruses: an update. *Can. J. Microbiol.* 63, 193–211. <https://doi.org/10.1139/cjm-2016-0519>
- Biogen GmbH, PEI, 2017a. Arzt-Information & Management Leitlinien für Multiple Sklerose Patienten die Tysabri erhalten [WWW Document]. *Biog.* 17. URL https://www.pei.de/SharedDocs/Downloads/vigilanz/schulungsmaterial/Tysabri-Schulungsmaterial-Aerzte_Version-17_Arztinformation.pdf?__blob=publicationFile&v=4
- Biogen GmbH, PEI, 2017b. Arzt-Information & Management Leitlinien für Multiple Sklerose Patienten die Tysabri erhalten [WWW Document]. *Biog.* 17.
- Bohra, C., Sokol, L., Dalia, S., 2017. Progressive Multifocal Leukoencephalopathy and Monoclonal Antibodies: A Review. *Cancer Control* 24, 1073274817729901. <https://doi.org/10.1177/1073274817729901>
- Bonilla, F.A., Notarangelo, L.D., Tepas, E., 2016. Combined immunodeficiencies [WWW Document]. 2017 UpToDate. URL www.uptodate.com
- Boukhoum, H., Nahdi, I., Sahtout, W., Skiri, H., Segondy, M., Aouni, M., 2016. BK and JC virus infections in healthy patients compared to kidney transplant recipients in Tunisia. *Microb. Pathog.* 97, 204–208. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.06.015>
- Brickelmaier, M., Lugovskoy, A., Kartikeyan, R., Reviriego-Mendoza, M.M., Allaire, N., Simon, K., Frisque, R.J., Gorelik, L., 2009. Identification and characterization of mefloquine efficacy against JC virus in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 1840–1849. <https://doi.org/10.1128/AAC.01614-08>
- Broekema, N.M., Imperiale, M.J., 2013. miRNA regulation of BK polyomavirus replication during early infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 8200–8205.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1301907110>

- Brooks BR, W.D., 1984. Progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurol. Clin.* 2, 299–313. https://doi.org/10.1007/978-3-319-31190-6_6
- Buck, C.B., Phan, G.Q., Raiji, M.T., Murphy, P.M., McDermott, D.H., McBride, A.A., 2012. Complete genome sequence of a tenth human polyomavirus. *J. Virol.* 86, 10887. <https://doi.org/10.1128/JVI.01690-12>
- Buck, C.B., Van Doorslaer, K., Peretti, A., Geoghegan, E.M., Tisza, M.J., An, P., Katz, J.P., Pipas, J.M., McBride, A.A., Camus, A.C., McDermott, A.J., Dill, J.A., Delwart, E., Ng, T.F.F., Farkas, K., Austin, C., Kraberger, S., Davison, W., Pastrana, D. V., Varsani, A., 2016. The Ancient Evolutionary History of Polyomaviruses. *PLoS Pathog.* 12, e1005574. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005574>
- Calvignac-Spencer, S., Feltkamp, M.C.W., Daugherty, M.D., Moens, U., Ramqvist, T., Johne, R., Ehlers, B., 2016. A taxonomy update for the family Polyomaviridae. *Arch. Virol.* 161, 1739–1750. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2794-y>
- Caracciolo, V., Reiss, K., Khalili, K., De Falco, G., Giordano, A., 2006. Role of the interaction between large T antigen and Rb family members in the oncogenicity of JC virus. *Oncogene* 25, 5294–5301. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209681>
- Carr, M., Gonzalez, G., Sasaki, M., Ito, K., Ishii, A., Hang’Ombe, B.M., Mweene, A.S., Orba, Y., Sawa, H., 2017. Discovery of African bat polyomaviruses and infrequent recombination in the large T antigen in the Polyomaviridae. *J. Gen. Virol.* 98, 726–738. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000737>
- Casado, J.L., Corral, I., García, J., Martínez-San Millán, J., Navas, E., Moreno, A., Moreno, S., 2014. Continued declining incidence and improved survival of progressive multifocal leukoencephalopathy in HIV/AIDS patients in the current era. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 33, 179–187. <https://doi.org/10.1007/s10096-013-1941-6>
- Casan, J., Wong, J., Northcott, M., S., O., 2018. Anti-CD20 monoclonal antibodies: reviewing a revolution. *Hum Vaccin Immunother.* 14, 2820–2841. <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1508624>
- Cavanagh, J.B., Greenbaum, D., Marshall, A.H.E., Rubinstein, L.J., 1959. Cerebral demyelination associated with disorders of the reticuloendothelial system. *Lancet* 2, 524–529. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(59\)91774-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(59)91774-X)
- Chang, D., Liou, Z.M., Ou, W.C., Wang, K.Z., Wang, M., Fung, C.Y., Tsai, R.T., 1996. Production of the antigen and the antibody of the JC virus major capsid protein VP1. *J. Virol. Methods* 59, 177–187. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(96\)02039-3](https://doi.org/10.1016/0166-0934(96)02039-3)
- Chapagain, M.L., Nerurkar, V.R., 2010. Human Polyomavirus JC (JCV) Infection of Human B Lymphocytes: A Possible Mechanism for JCV Transmigration across the Blood-Brain Barrier. *J. Infect. Dis.* 202, 184–191. <https://doi.org/10.1086/653823>
- Chappelle, R., 2009. FDA Statement on the Voluntary Withdrawal of Raptiva From the U.S. Market [WWW Document]. 301-796-4672, FDA.
- Chen, N.N., Chang, C.F., Gallia, G.L., Kerr, D.A., Johnson, E.M., Krachmarov, C.P., Barr, S.M., Frisque, R.J., Bollag, B., Khalili, K., 1995. Cooperative action of cellular proteins YB-1 and Pur alpha with the tumor antigen of the human JC polyomavirus determines their

- interaction with the viral lytic control element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 1087–1091. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.4.1087>
- Chen, Y., Xu, Y., Bao, Q., Xing, Y., Li, Z., Lin, Z., Stock, J.B., Jeffrey, P.D., Shi, Y., 2007. Structural and biochemical insights into the regulation of protein phosphatase 2A by small t antigen of SV40. *Struct. Mol. Biol.* 14, 527–534. <https://doi.org/10.1038/nsmb1254>
- Chun, J., Hartung, H.P., 2010. Mechanism of action of oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis. *Clin. Neuropharmacol.* 33, 91–101. <https://doi.org/10.1097/WNF.0b013e3181cbf825>
- Ciappi, S., Azzi, A., De Santis, R., Leoncini, F., Sterrantino, G., Mazzotta, F., Mecocci, L., 1999. Archetypal and rearranged sequences of human polyomavirus JC transcription control region in peripheral blood leukocytes and in cerebrospinal fluid. *J. Gen. Virol.* 80, 1017–1023. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-4-1017>
- Clifford, D.B., Nath, A., Cinque, P., Brew, B.J., Zivadinov, R., Gorelik, L., Zhao, Z., Duda, P., 2013. A study of mefloquine treatment for progressive multifocal leukoencephalopathy: Results and exploration of predictors of PML outcomes. *J. Neurovirol.* 19, 351–358. <https://doi.org/10.1007/s13365-013-0173-y>
- Cook, L., 2016. Polyomaviruses. *Microbiol Spectr.* 4, 4. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.DMIH2-0010-2015.Correspondence>
- Corpet, F., 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* 16, 10881–10890. <https://doi.org/10.1093/nar/16.22.10881>
- Cubitt, C.L., Cui, X., Agostini, H.T., Nerurkar, V.R., Scheirich, I., Yanagihara, R., Ryschkewitsch, C.F., Stoner, G.L., 2001. Predicted amino acid sequences for 100 JCV strains. *J. Neurovirol.* 7, 339–344. <https://doi.org/10.1080/13550280152537201>
- Cuesta, I., Núñez-Ramírez, R., Scheres, S.H.W., Gai, D., Chen, X.S., Fanning, E., Carazo, J.M., 2010. Conformational rearrangements of SV40 large T antigen during early replication events. *J. Mol. Biol.* 397, 1276–1286. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.02.042>
- del Pilar Martin, M., Cravens, P.D., Winger, R., Frohman, E.M., Racke, M.K., Eagar, T.N., Zamvil, S.S., Weber, M.S., Hemmer, B., Karandikar, N.J., Kleinschmidt-DeMasters, B.K., Stuve, O., 2008. Decrease in the numbers of dendritic cells and CD4+ T cells in cerebral perivascular spaces due to natalizumab. *Arch Neurol* 65, 1596–1603. <https://doi.org/10.1001/archneur.65.12.noc80051>
- Delbue, S., Branchetti, E., Bertolacci, S., Tavazzi, E., Marchioni, E., Maserati, R., Minnucci, G., Tremolada, S., Vago, G., Ferrante, P., 2009. JC virus VP1 loop-specific polymorphisms are associated with favorable prognosis for progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neurovirol* 15, 51–56. <https://doi.org/10.1080/13550280802425467>
- Demko, S., Summers, J., Keegan, P., Pazdur, R., 2008. FDA Drug Approval Summary: Alemtuzumab as Single-Agent Treatment for B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Oncologist* 13, 167–174. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2007-0218>
- Dickmanns, A., Zeitvogel, A., Simmersbach, F., Weber, R., Arthur, A.K., Dehde, S., Wildeman, A.G., Fanning, E., 1994. The kinetics of simian virus 40-induced progression

- of quiescent cells into S phase depend on four independent functions of large T antigen. *J. Virol.* 68, 5496–5508.
- Doerries, K., 2006. Human polyomavirus JC and BK persistent infection. *Adv. Exp. Med. Biol.* 39, 165–175. https://doi.org/10.1007/0-387-32957-9_8
- Dong-Si, T., Gheuens, S., Gangadharan, A., Wenten, M., Philip, J., McIninch, J., Datta, S., Richert, N., Bozic, C., Bloomgren, G., Richman, S., Weber, T., Clifford, D.B., 2015. Predictors of survival and functional outcomes in natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Neurovirol.* 21, 637–644. <https://doi.org/10.1007/s13365-015-0316-4>
- Dörries, K., Vogel, E., Günther, S., Czub, S., 1994. Infection of human polyomaviruses JC and BK in peripheral blood leukocytes from immunocompetent individuals. *Virology* 198, 59–70. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1008>
- Dugan, A.S., Gasparovic, M.L., Atwood, W.J., 2008. Direct correlation between sialic acid binding and infection of cells by two human polyomaviruses (JC virus and BK virus). *J. Virol.* 82, 2560–2564. <https://doi.org/10.1128/JVI.02123-07>
- E. EU, 2014. CHMP assessment report Gazyvaro [WWW Document]. Eur. Med. Agency EMA/CHMP/231450/2014. URL https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/gazyvaro-epar-public-assessment-report_en.pdf (accessed 9.15.19).
- Elphick, G.F., Querbes, W., Jordan, J.A., Gee, G. V., Eash, S., Manley, K., Dugan, A., Stanifer, M., Bhatnagar, A., Kroeze, W.K., Roth, B.L., Atwood, W.J., 2004. The human polyomavirus, JCV, uses serotonin receptors to infect cells. *Science* (80-). 306, 1380–1383. <https://doi.org/10.1126/science.1103492>
- Engelhardt, K.R., McGhee, S., Winkler, S., Sassi, A., Woellner, C., Lopez-Herrera, G., Chen, A., Kim, H.S., Lloret, M.G., Schulze, I., Ehl, S., Thiel, J., Pfeifer, D., Veelken, H., Niehues, T., Siepermann, K., Weinspach, S., Reisli, I., Keles, S., Genel, F., Kutukculer, N., Camcioglu, Y., Somer, A., Karakoc-Aydiner, E., Barlan, I., Gennery, A., Metin, A., Degerliyurt, A., Pietrogrande, M.C., Yeganeh, M., Baz, Z., Al-Tamemi, S., Klein, C., Puck, J.M., Holland, S.M., McCabe, E.R., Grimbacher, B., Chatila, T.A., 2009. Large deletions and point mutations involving the dedicator of cytokinesis 8 (DOCK8) in the autosomal-recessive form of hyper-IgE syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 124, 1289–302 e4. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.10.038>
- Engsig, F.N., Hansen, A.-B.E., Omland, L.H., Kronborg, G., Gerstoft, J., Laursen, A.L., Pedersen, C., Mogensen, C.B., Nielsen, L., Obel, N., 2009. Incidence, clinical presentation, and outcome of progressive multifocal leukoencephalopathy in HIV-infected patients during the highly active antiretroviral therapy era: a nationwide cohort study. *J. Infect. Dis.* 199, 77–83. <https://doi.org/10.1086/595299>
- Erskine, D., 2019. Risk of progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) with biological agents in autoimmune disorders: Review of spontaneous confirmed cases (June 2019). London.
- EU, E.M.A., 2017a. EPAR summary for the public-Adcetris brentuximab vedotin [WWW Document]. Eur. Med. Agency EMA/780089/2017 EMEA/H/C/002455. URL http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-

- [_Summary_for_the_public/human/002455/WC500135004.pdf](#)
- EU, E.M.A., 2017b. EPAR summary for the public- Gazyvaro obinutuzumab [WWW Document]. Eur. Med. Agency EMA/505526/2017 EMEA/H/C/002799. URL http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/002799/WC500171597.pdf
- EU, E.M.A., 2017c. Zusammenfassung des EPAR für die Öffentlichkeit - Gilenya Fingolimod, European Medicines Agency: EMA/818399/2017 EMEA/H/C/002202.
- EU, E.M.A., 2016a. Refusal of a change to the marketing authorisation for Arzerra (ofatumumab) [WWW Document]. Eur. Med. Agency EMA/433595/2016 EMEA/H/C/001131/II/0041. URL http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Summary_of_opinion/human/001131/WC500209336.pdf
- EU, E.M.A., 2016b. EMA confirms recommendations to minimise risk of brain infection PML with Tysabri [WWW Document]. Eur. Med. Agency EMA /137488/2016. URL http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Press_release/2016/02/WC500202389.pdf (accessed 9.20.18).
- EU, E.M.A., 2015a. Zusammenfassung des EPAR für die Öffentlichkeit Jakavi - Ruxolitinib [WWW Document]. Eur. Med. Agency EMA/99179/2015 EMEA/H/C/002464. URL http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/002464/WC500133225.pdf
- EU, E.M.A., 2015b. Zusammenfassung des EPAR für die Öffentlichkeit CellCept Mycophenolatmofetil [WWW Document]. Eur. Med. Agency EMA/741301/2015 EMEA/H/C/000082. URL file:///C:/Users/USER/Desktop/PhD_13.10.17/PhD_alles/jc.pml.papers/Natalizumab/WC500021859_CellCept_2015.pdf
- EU, E.M.A., 2014a. Summary of opinion (post authorisation) - Arzerra ofatumumab [WWW Document]. Eur. Med. Agency / Comm. Med. Prod. Hum. Use EMA/CHMP/312178/2014. URL http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Summary_of_opinion/human/001131/WC500167525.pdf
- EU, E.M.A., 2014b. Zusammenfassung des EPAR für die Öffentlichkeit - Tecfidera Dimethylfumarat [WWW Document]. Eur. Med. Agency EMA/119613/2014 EMEA/H/C/002601. URL http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/002601/WC500162072.pdf
- EU, E.M.A., 2012. Public Statement on MabCampath (alemtuzumab) Withdrawal of the marketing authorisation in the European Union [WWW Document]. Eur. Med. Agency EMA/532364/2012. URL http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Public_statement/2012/08/WC500130945.pdf
- EU, E.M.A., 2009. Public Statement on Raptiva (efalizumab) Withdrawal of the marketing authorisation in the European Union [WWW Document]. Eur. Med. Agency EMA/487107/2009. URL

- http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Public_statement/2009/11/WC500009129.pdf
- EU, E.M.A., 2008. MabCampath, Alemtuzumab [WWW Document]. Eur. Med. Agency EMA/266219/2011, EMEA/H/C/000353. URL http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000353/human_med_000896.jsp&mid=WC0b01ac058001d124
- Eurofins, 2018. SAMPLE SUBMISSION GUIDE [WWW Document]. URL https://www.eurofinsgenomics.eu/media/1440341/samplesubmissionguide_primer_walking.pdf (accessed 9.26.18).
- Fang, C.Y., Lin, P.Y., Ou, W.C., Chen, P.L., Shen, C.H., Chang, D., Wang, M., 2012. Analysis of the size of DNA packaged by the human JC virus-like particle. *J. Virol. Methods* 182, 87–92. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.03.017>
- FDA, 2016. FDA Drug Safety Communication: New Boxed Warning and Contraindication for Adcetris (brentuximab vedotin) [WWW Document]. URL <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-drug-safety-communication-new-boxed-warning-and-contraindication-adcetris-brentuximab-vedotin>
- Feigenbaum, L., Khalili, K., Major, E., Houry, G., 1987. Regulation of the host range of human papovavirus JCV. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 3695–3698. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.11.3695>
- Feng, H., Shuda, M., Chang, Y., Moore, P.S., 2008. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* (80-.). 319, 1096–1100. <https://doi.org/10.1126/science.1152586>
- Ferenczy, M.W., Marshall, L.J., Nelson, C.D., Atwood, W.J., Nath, A., Khalili, K., Major, E.O., 2012. Molecular biology, epidemiology, and pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy, the JC virus-induced demyelinating disease of the human brain. *Clin Microbiol Rev* 25, 471–506. <https://doi.org/10.1128/CMR.05031-11>
- Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., 2007. *Fields Virology*, 5th Edition, Fields Virology.
- Fields, B.N., Knipe, D.N., Howley, P.M., 2013. *Fields' Virology - Sixth Edition*, Fields Vir. ed, Lippincott Williams & Wilkins. <https://doi.org/9781451105636>
- Fox, R.J., Rudick, R.A., 2012. Risk stratification and patient counseling for natalizumab in multiple sclerosis. *Neurology* 78, 436–437. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318245d2d0>
- Frisque, R.J., 1983. Regulatory Sequences and Virus-Cell Interactions of JC Virus. *Prog. Clin. Biol. Res.* 105, 41–59.
- Frisque, R.J., Bream, G.L., Cannella, M.T., 1984. Human polyomavirus JC virus genome. *J. Virol.* 51, 458–469.
- Gardner, S.D., 1973. Prevalence in England of Antibody to Human Polyomavirus (B.K.). *Br. Med. J.* 1, 77–78. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.5845.77>
- Gardner, S.D., Field, A.M., Coleman, D. V., Hulme, B., 1971. New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet* 1, 1253–1257.

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(71\)91776-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(71)91776-4)

- Gardner, S.D., MacKenzie, E.F., Smith, C., Porter, a a, 1984. Prospective study of the human polyomaviruses BK and JC and cytomegalovirus in renal transplant recipients. *J. Clin. Pathol.* 37, 578–586. <https://doi.org/10.1136/jcp.37.5.578>
- Gaynor, A.M., Nissen, M.D., Whiley, D.M., Mackay, I.M., Lambert, S.B., Wu, G., Brennan, D.C., Storch, G.A., Sloots, T.P., Wang, D., 2007. Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathog.* <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030064>
- Geoghegan, E.M., Pastrana, D. V., Schowalter, R.M., Ray, U., Gao, W., Ho, M., Pauly, G.T., Sigano, D.M., Kaynor, C., Cahir-McFarland, E., Combaluzier, B., Grimm, J., Buck, C.B., 2017. Infectious Entry and Neutralization of Pathogenic JC Polyomaviruses. *Cell Rep.* 21, 1169–1179. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.027>
- Gheuens, S., Bord, E., Kesari, S., Simpson, D.M., Gandhi, R.T., Clifford, D.B., Berger, J.R., Ngo, L., Koralnik, I.J., 2011. Role of CD4+ and CD8+ T-cell responses against JC virus in the outcome of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) and PML with immune reconstitution inflammatory syndrome. *J. Virol.* 85, 7256–7263. <https://doi.org/10.1128/JVI.02506-10>
- Ghosh, P.K., Lebowitz, P., Frisque, R.J., Gluzman, Y., 1981. Identification of a promoter component involved in positioning the 5' termini of simian virus 40 early mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 100–104.
- Ghosh, S., Schuster, F.R., Adams, O., Babor, F., Borkhardt, A., Comoli, P., Handgretinger, R., Lang, P., Laws, H.J., Siepermann, M., Meisel, R., 2014. Haploidentical stem cell transplantation in DOCK8 deficiency - Successful control of pre-existing severe viremia with a TCRass/CD19-depleted graft and antiviral treatment. *Clin Immunol* 152, 111–114. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2014.03.006>
- Gluzman, Y., Sambrook, J.F., Frisque, R.J., 1980. Expression of early genes of origin-defective mutants of simian virus 40. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 3898–3902.
- Gorelik, L., Lerner, M., Bixler, S., Crossman, M., Schlain, B., Simon, K., Pace, A., Cheung, A., Chen, L.L., Berman, M., Zein, F., Wilson, E., Yednock, T., Sandrock, A., Goelz, S.E., Subramanyam, M., 2010. Anti-JC Virus Antibodies: Implications for PML Risk Stratification. *Ann. Neurol.* 68, 295–303. <https://doi.org/10.1002/ana.22128>
- Gorelik, L., Reid, C., Testa, M., Brickelmaier, M., Bossolasco, S., Pazzi, A., Bestetti, A., Carmillo, P., Wilson, E., McAuliffe, M., Tonkin, C., Carulli, J.P., Lugovskoy, A., Lazzarin, A., Sunyaev, S., Simon, K., Cinque, P., 2011. Progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) development is associated with mutations in JC virus capsid protein VP1 that change its receptor specificity. *J Infect Dis* 204, 103–114. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir198>
- Gosert, R., Kardas, P., Major, E.O., Hirsch, H.H., 2010. Rearranged JC virus noncoding control regions found in progressive multifocal leukoencephalopathy patient samples increase virus early gene expression and replication rate. *J Virol* 84, 10448–10456. <https://doi.org/10.1128/JVI.00614-10>
- Gross, L., 1953. A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. *Proc Soc Exp Biol Med.* 83, 414–21.

- Guex, N., Peitsch, M.C., 1997. SWISS - MODEL and the Swiss - PdbViewer : An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18, 2714–2723. <https://doi.org/10.1002/elps.1150181505>
- Gupta, S., Weinstock-Guttman, B., 2014. Natalizumab for multiple sclerosis: appraising risk versus benefit, a seemingly demanding tango. *Expert Opin. Biol. Ther.* 14, 115–126. <https://doi.org/10.1517/14712598.2014.864634>
- Haley, S.A., Atwood, W.J., 2017. Progressive Multifocal Leukoencephalopathy: Endemic Viruses and Lethal Brain Disease. *Annu Rev Virol* 4, 349–367. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-101416-041439>
- Hallervorderden, J., 1930. “Eigenartige und nicht rubrizierbare Prozesse” , Kapitel: “Die Anatomie der Psychosen,” in: Oswald, B.K.B.K.B.E.B.A. v. B.O.B.H.B.C.J.L.E.G.E.E.G.F.G.H.G.E.G.J.H.A.H.A.H.F.J.W.J.A.J.H.J.V.K. (Ed.), *Handbuch Der Geisteskrankheiten*. Julius Springer in Berlin W 9, pp. 1063–1107.
- Hammer, M., 2002. A nomenclature system for the tree of human Y-Chromosomal binary haplogroups. *Genome Res.* 12, 339–348. <https://doi.org/10.1101/gr.217602>
- Henson, J.W., 1994. Regulation of the glial-specific JC virus early promoter by the transcription factor Sp1. *J. Biol. Chem.* 269, 1046–1050.
- Heritage, J., Chesters, P.M., McCance, D.J., 1981. The persistence of papovavirus BK DNA sequences in normal human renal tissue. *J. Med. Virol.* 8, 143–150. <https://doi.org/10.1002/jmv.1890080208>
- Hirsch, H.H., Kardas, P., Kranz, D., Leboeuf, C., 2013. The human JC polyomavirus (JCPyV): virological background and clinical implications. *APMIS* 121, 685–727. <https://doi.org/10.1111/apm.12128>
- Ho, J., Jedrych, J.J., Feng, H., Natalie, A.A., Grandinetti, L., Mirvish, E., Crespo, M.M., Yadav, D., Fasanella, K.E., Proksell, S., Kuan, S.F., Pastrana, D. V., Buck, C.B., Shuda, Y., Moore, P.S., Chang, Y., 2015. Human polyomavirus 7-associated pruritic rash and viremia in transplant recipients. *J. Infect. Dis.* 211, 1560–1565. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu524>
- Holman, R.C., Torok, T.J., Belay, E.D., Janssen, R.S., Schonberger, L.B., 1998. Progressive multifocal leukoencephalopathy in the United States, 1979-1994: increased mortality associated with HIV infection. *Neuroepidemiology* 17, 303–309.
- Houff, S., Major, E., Katz, D., Kufta, C., Sever, J., Pittaluga, S., Roberts, J., Gitt, J., Sain, N., Lux, W., 1988. Involvement of JC virus-infected mononuclear cells from the bone marrow and spleen in the pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy. *N Engl J Med.* 318, 301–5.
- Houff, S.A., Berger, J.R., 2008. The bone marrow, B cells, and JC virus. *J. Neurovirol.* 14, 341–343. <https://doi.org/10.1080/13550280802348222>
- Huai-Ying, Z., 2005. Characterization of the VP1 loop mutations widespread among JC polyomavirus isolates associated with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333, 996–1002. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2005.06.012>
- Hurdiss, D.L., Morgan, E.L., Thompson, R.F., Prescott, E.L., Panou, M.M., Macdonald, A.,

- Ranson, N.A., 2016. New Structural Insights into the Genome and Minor Capsid Proteins of BK Polyomavirus using Cryo-Electron Microscopy. *Structure* 24, 528–536. <https://doi.org/10.1016/j.str.2016.02.008>
- ICTV, 2018. ICTV Virus Taxonomy Profile: Polyomaviridae [WWW Document]. ICTV Rep. July 2018. URL https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/dsdna-viruses/w/polyomaviridae (accessed 9.20.18).
- Iida, T., Kitamura, T., Guo, J., Taguchi, F., Aso, Y., Nagashima, K., Yogo, Y., 1993. Origin of JC polyomavirus variants associated with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 5062–5065. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.11.5062>
- Ikegaya, H., Iwase, H., Zheng, H.Y., Nakajima, M., Sakurada, K., Takatori, T., Fukayama, M., Kitamura, T., Yogo, Y., 2005. JC virus genotyping using formalin-fixed, paraffin-embedded renal tissues. *J. Virol. Methods* 126, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.01.019>
- Imperiale, M.J., Jiang, M., 2016. Polyomavirus Persistence. *Annu. Rev. Virol.* 3, 517–532. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042226>
- Imperiale, M.J., Jiang, M., 2015. What DNA Viral Genomic Rearrangements Tell Us About Persistence. *J. Virol.* 89, 1948–1950. <https://doi.org/10.1128/JVI.01227-14>
- Ivan, J., Benoit, C., Ilijas, J., Mireia, S., Jan, G., Roland, M., 2017. Prevention and therapy of JC polyomavirus-mediated progressive multifocal leukoencephalopathy – a realistic possibility? *Swiss Med. Wkly.* 147, w14520. <https://doi.org/10.4414/smw.2017.14520>
- Jelcic, I., Combaluzier, B., Jelcic, I., Faigle, W., Senn, L., Reinhart, B.J., Stroh, L., Nitsch, R.M., Stehle, T., Sospedra, M., Grimm, J., Martin, R., 2015. Broadly neutralizing human monoclonal JC polyomavirus VP1-specific antibodies as candidate therapeutics for progressive multifocal leukoencephalopathy. *Sci Transl Med* 7, 306ra150. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aac8691>
- Jobling, M.A., Tyler-Smith, C., 2003. The human Y chromosome: An evolutionary marker comes of age. *Nat. Rev. Genet.* 4, 598–612. <https://doi.org/10.1038/nrg1124>
- Johnson, E.M., Wortman, M.J., Dagdanova, A. V., Lundberg, P.S., Daniel, D.C., 2013. Polyomavirus JC in the context of immunosuppression: A series of adaptive, DNA replication-driven recombination events in the development of progressive multifocal leukoencephalopathy. *Clin. Dev. Immunol.* 2013, 197807. <https://doi.org/10.1155/2013/197807>
- Jones, H.R., Hedley-Whyte, E.T., Freidberg, S.R., Kelleher, J.E., Krolkowski, J., 1982. Primary cerebellopontine progressive multifocal leukoencephalopathy diagnosed premortem by cerebellar biopsy. *Ann. Neurol.* 11, 199–202. <https://doi.org/10.1002/ana.410110218>
- Kazem, S., Lauber, C., van der Meijden, E., Kooijman, S., Kravchenko, A.A., Feltkamp, M.C.W., Gorbalenya, A.E., Browning, J.C., Busam, K., Bialasiewicz, S., Benoit, T., Fleckman, P., Hughey, L.C., Janssens, R.W.A., Mechinaud, F., Pope, E., Rosenberg, A.S., Raćz, E., Sadler, G., Tabrizi, S.N., de Vries, E., Wang, R.C., 2016. Limited variation during circulation of a polyomavirus in the human population involves the COCO-VA toggling site of Middle and Alternative T-antigen(s). *Virology* 487, 129–140. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.09.013>

- Khalili, K., Feigenbaum, L., Khoury, G., 1987. Evidence for a shift in 5'-termini of early viral RNA during the lytic cycle of JC virus. *Virology* 158, 469–472. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(87\)90224-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(87)90224-8)
- Khalili, K., Sariyer, I.K., Safak, M., 2008. Small tumor antigen of polyomaviruses: Role in viral life cycle and cell transformation. *J. Cell. Physiol.* 215, 309–319. <https://doi.org/10.1002/jcp.21326>
- Khalili, K., White, M.K., Sawa, H., Nagashima, K., Safak, M., 2005. The agnoprotein of polyomaviruses: A multifunctional auxiliary protein. *J. Cell. Physiol.* 204, 1–7. <https://doi.org/10.1002/jcp.20266>
- Kitchen, A., Miyamoto, M.M., Mulligan, C.J., 2008. Utility of DNA viruses for studying human host history: Case study of JC virus. *Mol. Phylogenet. Evol.* 46, 673–682. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2007.09.005>
- Koonin, E. V., Dolja, V. V., Krupovic, M., 2015. Origins and evolution of viruses of eukaryotes: The ultimate modularity. *Virology* 479–480, 2–25. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.039>
- Korup, S., Rietscher, J., Calvignac-Spencer, S., Trusch, F., Hofmann, J., Moens, U., Sauer, I., Voigt, S., Schmuck, R., Ehlers, B., 2013. Identification of a novel human polyomavirus in organs of the gastrointestinal tract. *PLoS One* 8, e58021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058021>
- L'Honneur, A.S., Leh, H., Laurent-Tchenio, F., Hazan, U., Rozenberg, F., Bury-Mone, S., 2018. Exploring the role of nccr variation on jc polyomavirus expression from dual reporter minicircles. *PLoS One* 13, e0199171. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199171>
- Landesuntersuchungsanstalt_Sachsen; RKI; 2006. Verschlüsselung von Patienten-Namen gemäß RKI-Vorgaben.
- Lane, D.P., Crawford, L. V, 1979. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278, 261–263. <https://doi.org/10.1038/278261a0>
- Lecatsas, G., et al., Prozesky, O., van Wyk, J., Els, H., 1973. Papova virus in urine after renal transplantation. *Nature*. 241, 343–344.
- Li, D., Zhao, R., Lilyestrom, W., Gai, D., Zhang, R., DeCaprio, J.A., Fanning, E., Jochimiak, A., Szakonyi, G., Chen, X.S., 2003. Structure of the replicative helicase of the oncoprotein SV40 large tumour antigen. *Nature* 423, 512–518. <https://doi.org/10.1038/nature01691>
- Liddington, R.C., Yan, Y., Moulai, J., Sahli, R., Benjamin, T.L., Harrison, S.C., 1991. Structure of simian virus 40 at 3.8-Å resolution. *Nature* 354, 278–284. <https://doi.org/10.1038/354278a0>
- Lim, E.S., Reyes, A., Antonio, M., Saha, D., Ikumapayi, U.N., Adeyemi, M., Stine, O.C., Skelton, R., Brennan, D.C., Mkakosya, R.S., Manary, M.J., Gordon, J.I., Wang, D., 2013. Discovery of STL polyomavirus, a polyomavirus of ancestral recombinant origin that encodes a unique T antigen by alternative splicing. *Virology* 436, 295–303. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.12.005>
- Lima, M., Bernal-Cano, F., Clifford, D., Gandhi, R., Korálnik, I., 2010. Clinical outcome of long-term survivors of progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neurol*

- Lundin, J., Osterborg, A., Brittinger, G., Crowther, D., Dombret, H., Engert, A., Epenetos, A., Gisselbrecht, C., Huhn, D., Jaeger, U., Thomas, J., Marcus, R., Nissen, N., Poynton, C., Rankin, E., Stahel, R., Uppenkamp, M., Willemze, R., Mellstedt, H., 1998. CAMPATH-1H monoclonal antibody in therapy for previously treated low-grade non-Hodgkin's lymphomas: a phase II multicenter study. European Study Group of CAMPATH-1H Treatment in Low-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 16, 3257–3263.
- Lynch, K.J., Frisque, R.J., 1990. Identification of critical elements within the JC virus DNA replication origin. *J. Virol.* 64, 5812–5822.
- Maginnis, M.S., Stroh, L.J., Gee, G. V, O'Hara, B.A., Derdowski, A., Stehle, T., Atwood, W.J., 2013. Progressive multifocal leukoencephalopathy-associated mutations in the JC polyomavirus capsid disrupt lactoseries tetrasaccharide c binding. *MBio* 4, e00247-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00247-13>
- Major, E., 2009. Reemergence of PML in natalizumab treated patients--new cases, same concerns. *N Engl J Med.* 361, 1041–1043. <https://doi.org/10.1056/NEJMp0906248>
- Major, E.O., 2010. Progressive Multifocal Leukoencephalopathy in Patients on Immunomodulatory Therapies. *Annu. Rev. Med.* 61, 35–47. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.080708.082655>
- Major, E.O., Amemiya, K., Tornatore, C.S., Houff, S.A., Berger, J.R., 1992. Pathogenesis and molecular biology of progressive multifocal leukoencephalopathy, the JC virus-induced demyelinating disease of the human brain. *Clin. Microbiol. Rev.* 5, 49–73. <https://doi.org/10.1128/CMR.5.1.49>
- Major, E.O., Miller, A.E., Mourrain, P., Traub, R.G., de Widt, E., Sever, J., 1985. Establishment of a line of human fetal glial cells that supports JC virus multiplication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82, 1257–1261. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.4.1257>
- Major, E.O., Yousry, T.A., Clifford, D.B., 2018. Pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy and risks associated with treatments for multiple sclerosis: a decade of lessons learned. *Lancet Neurol.* 17, 467–480. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30040-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30040-1)
- Manley, K., O'hara, B. a, Gee, G. V, Simkevich, C.P., Sedivy, J.M., Atwood, W.J., 2006. NFAT4 is required for JC virus infection of glial cells. *J. Virol.* 80, 12079–12085. <https://doi.org/10.1128/JVI.01456-06>
- Marsh, M., Helenius, A., 2006. Virus entry: Open sesame. *Cell* 124, 729–740. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.007>
- Marshall, L.J., Dunham, L., Major, E.O., 2010. Transcription factor Spi-B binds unique sequences present in the tandem repeat promoter/enhancer of JC virus and supports viral activity. *J Gen Virol* 91, 3042–3052. <https://doi.org/10.1099/vir.0.023184-0>
- Marshall, L.J., Ferenczy, M.W., Daley, E.L., Jensen, P.N., Ryschkewitsch, C.F., Major, E.O., 2014. Lymphocyte Gene Expression and JC Virus Noncoding Control Region Sequences Are Linked with the Risk of Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. *J. Virol.* 88, 5177–5183. <https://doi.org/10.1128/JVI.03221-13>

- Marshall, L.J., Moore, L.D., Mirsky, M.M., Major, E.O., 2012. JC virus promoter/enhancers contain TATA box-associated Spi-B-binding sites that support early viral gene expression in primary astrocytes. *J Gen Virol* 93, 651–661. <https://doi.org/10.1099/vir.0.035832-0>
- Martin, J.D., King, D.M., Slauch, J.M., Frisque, R.J., 1985. Differences in regulatory sequences of naturally occurring JC virus variants. *J. Virol.* 53, 306–311.
- Marzocchetti, A., Lima, M., Tompkins, T., Kavanagh, D.G., Gandhi, R.T., O’Neill, D.W., Bhardwaj, N., Koranik, I.J., 2009. Efficient in vitro expansion of JC virus-specific CD8(+) T-cell responses by JCV peptide-stimulated dendritic cells from patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Virology* 383, 173–177. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.10.046>
- McKee, S., 2012. Sanofi withdraws Campath in US and EU [WWW Document]. *Pharma Times* online. URL http://www.pharmatimes.com/news/sanofi_withdraws_campath_in_us_and_eu_976762 (accessed 9.19.18).
- Meira, M., Sievers, C., Hoffmann, F., Rasenack, M., Kuhle, J., Derfuss, T., Kappos, L., Lindberg, R.L.P., 2014. Unraveling natalizumab effects on deregulated miR-17 expression in CD4 + T cells of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *J. Immunol. Res.* 2014, 897249. <https://doi.org/10.1155/2014/897249>
- Messam, C.A., Hou, J., Gronostajski, R.M., Major, E.O., 2003. Lineage pathway of human brain progenitor cells identified by JC virus susceptibility. *Ann. Neurol.* 53, 636–646. <https://doi.org/10.1002/ana.10523>
- Mills, E.A., Ogrodnik, M.A., Plave, A., Mao-Draayer, Y., 2018. Emerging understanding of the mechanism of action for dimethyl fumarate in the treatment of multiple sclerosis. *Front. Neurol.* 9, 5. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00005>
- Mishra, N., Pereira, M., Rhodes, R.H., An, P., Pipas, J.M., Jain, K., Kapoor, A., Briese, T., Faust, P.L., Ian Lipkin, W., 2014. Identification of a novel Polyomavirus in a pancreatic transplant recipient with retinal blindness and Vasculitic Myopathy. *J. Infect. Dis.* 210, 1595–1599. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu250>
- Moens, U., Calvignac-Spencer, S., Lauber, C., Ramqvist, T., Feltkamp, M.C.W., Daugherty, M.D., Verschoor, E.J., Ehlers, B., ICTV Report Consortium, 2017a. ICTV Virus Taxonomy Profile: Polyomaviridae. *J. Gen. Virol.* 98, 1159–1160. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000839>
- Moens, U., Krumbholz, A., Ehlers, B., Zell, R., Johne, R., Calvignac-Spencer, S., Lauber, C., 2017b. Biology, evolution, and medical importance of polyomaviruses: An update. *Infect. Genet. Evol.* 54, 18–38. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.06.011>
- Molloy, E.S., Calabrese, L.H., 2009. Progressive multifocal leukoencephalopathy: A national estimate of frequency in systemic lupus erythematosus and other rheumatic diseases. *Arthritis Rheum.* 60, 3761–3765. <https://doi.org/10.1002/art.24966>
- Monaco, M.C., Atwood, W.J., Gravell, M., Tornatore, C.S., Major, E.O., 1996. JC virus infection of hematopoietic progenitor cells, primary B lymphocytes, and tonsillar stromal cells: implications for viral latency. *J Virol* 70, 7004–7012.

- Monaco, M.C., Jensen, P.N., Hou, J., Durham, L.C., Major, E.O., 1998. Detection of JC virus DNA in human tonsil tissue: evidence for site of initial viral infection. *J Virol* 72, 9918–9923.
- Monaco, M.C., Major, E.O., 2015. JC Virus Infection of Hematopoietic Progenitor Cells, Primary B Lymphocytes, and Tonsillar Stromal Cells Implications for Viral Latency. *Front Immunol* 6, 159. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00159>
- Monaco, M.C.G., Major, E.O. 2, 2015. Immune system involvement in the pathogenesis of JC Virus induced PML What is learned from studies of patients with underlying diseases and therapies as risk factors. *Front. Immunol.* 6, 159. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00159>
- Nakahara, J., Tomaske, L., Kume, K., Takata, T., Kamada, M., Deguchi, K., Kufukihara, K., Schneider, R., Gold, R., Ayzenberg, I., 2019. Three cases of non-carryover fingolimod-PML: Is the risk in Japan increased? *Neurol. Neuroimmunol. NeuroInflammation* 6, e559. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000559>
- NCBI, 2000. JC virus complete genome GenBank: J02226.1 [WWW Document]. J02226.1. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/J02226.1> (accessed 10.4.18).
- NEB, 2018a. Protocol for a Routine PCR with Phusion® High-Fidelity PCR Kit [WWW Document]. NEW Engl. BioLabs Inc. URL <https://international.neb.com/protocols/2012/09/10/protocol-for-a-routine-pcr-reaction-e0553> (accessed 9.26.18).
- NEB, 2018b. Protocol Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with HF Buffer [WWW Document]. NEW Engl. BioLabs Inc. URL <https://international.neb.com/protocols/2012/09/06/protocol-phusion-high-fidelity-pcr-master-mix-with-hf-buffer-m0531> (accessed 9.26.18).
- Neu, U., Maginnis, M.S., Palma, A.S., Stroh, L.J., Nelson, C.D., Feizi, T., Atwood, W.J., Stehle, T., 2010a. Structure-function analysis of the human JC polyomavirus establishes the LSTc pentasaccharide as a functional receptor motif. *Cell Host Microbe* 8, 309–319. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.09.004>
- Neu, U., Stehle, T., Atwood, W.J., 2009. The Polyomaviridae: Contributions of virus structure to our understanding of virus receptors and infectious entry. *Virology* 384, 389–399. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.12.021>
- Neu, U., Stroeh, L., Stehle, T., 2010b. 3NXG -JC polyomavirus VP1 [WWW Document]. RCSB. <https://doi.org/10.2210/pdb3NXG/pdb>
- Oshima, Y., Tanimoto, T., Yuji, K., Tojo, A., 2018. Drug-associated progressive multifocal leukoencephalopathy in multiple sclerosis patients. *Mult Scler.* 25, 1141–1149. <https://doi.org/10.1177/1352458518786075>
- Outteryck, O., Zéphir, H., Salleron, J., Ongagna, J.C., Etxeberria, A., Collongues, N., Lacour, A., Fleury, M.C., Blanc, F., Giroux, M., De Seze, J., Vermersch, P., 2014. JC-virus seroconversion in multiple sclerosis patients receiving natalizumab. *Mult. Scler. J.* 20, 822–829. <https://doi.org/10.1177/1352458513505353>
- Padgett, B.L., Rogers, C.M., Walker, D.L., 1977. JC virus, a human polyomavirus associated with progressive multifocal leukoencephalopathy: additional biological characteristics

- and antigenic relationships. *Infect. Immun.* 15, 656–662.
- Padgett, B.L., Walker, D.L., 1973. Prevalence of antibodies in human sera against JC virus, an isolate from a case of progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Infect. Dis.* 127, 467–470. <https://doi.org/10.1093/infdis/127.4.467>
- Padgett, B.L., Zurhein, G.M., Walker, D.L., Eckroade, R.J., Dessel, B.H., 1971. Cultivation of Papova-like virus from human brain with Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. *Lancet* 297, 1257–1260. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(71\)91777-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(71)91777-6)
- Pallas, D.C., Shahrik, L.K., Martin, B.L., Jaspers, S., Miller, T.B., Brautigan, D.L., Roberts, T.M., 1990. Polyoma small and middle T antigens and SV40 small t antigen form stable complexes with protein phosphatase 2A. *Cell* 60, 167–176. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90726-U](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90726-U)
- Pastrana, D. V., Brennan, D.C., Çuburu, N., Storch, G.A., Viscidi, R.P., Randhawa, P.S., Buck, C.B., 2012. Neutralization serotyping of BK polyomavirus infection in kidney transplant recipients. *PLoS Pathog.* 8, e1002650. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002650>
- Perez-Liz, G., Del Valle, L., Gentilella, A., Croul, S., Khalili, K., 2008. Detection of JC virus DNA fragments but not proteins in normal brain tissue. *Ann. Neurol.* 64, 379–387. <https://doi.org/10.1002/ana.21443>
- Pina-Oviedo, S., Khalili, K., Del Valle, L., 2009. Hypoxia inducible factor-1 alpha activation of the JCV promoter: role in the pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy. *Acta Neuropathol.* 118, 235–247. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0533-0>
- Planas, R., Jelčić, I., Schippling, S., Martin, R., Sospedra, M., 2012. Natalizumab treatment perturbs memory- and marginal zone-like B-cell homing in secondary lymphoid organs in multiple sclerosis. *Eur. J. Immunol.* 42, 790–798. <https://doi.org/10.1002/eji.201142108>
- Ponchel, F., Toomes, C., Bransfield, K., Leong, F.T., Douglas, S.H., Field, S.L., Bell, S.M., Combaret, V., Puisieux, A., Mighell, A.J., Robinson, P.A., Inglehearn, C.F., Isaacs, J.D., Markham, A.F., 2003. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnol.* 3, 18. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-3-18>
- Qiagen, 2010. Quick-Start Protocol October 2010 Sample & Assay Technologies Quick-Start Protocol Sample & Assay Technologies. October 3–4.
- Qiagen,. QIAquick Gel Extraction Kit.
- Raisch, D.W., Rafi, J.A., Chen, C., Bennett, C.L., 2016. Detection of cases of progressive multifocal leukoencephalopathy associated with new biologicals and targeted cancer therapies from the FDA’s adverse event reporting system. *Expert Opin. Drug Saf.* 15, 1003–1011. <https://doi.org/10.1080/14740338.2016.1198775>
- Ravichandran, V., Major, E.O., 2008. DNA-binding transcription factor NF-1A negatively regulates JC virus multiplication. *J. Gen. Virol.* 89, 1396–1401. <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/000059-0>

- Ray, U., Cinque, P., Gerevini, S., Longo, V., Lazzarin, A., Schippling, S., Martin, R., Buck, C.B., Pastrana, D. V., 2015. JC polyomavirus mutants escape antibody-mediated neutralization. *Sci Transl Med* 7, 306ra151. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aab1720>
- Reid, C.E., Li, H., Sur, G., Carmillo, P., Bushnell, S., Tizard, R., McAuliffe, M., Tonkin, C., Simon, K., Goelz, S., Cinque, P., Gorelik, L., Carulli, J.P., 2011. Sequencing and analysis of JC virus DNA from natalizumab-treated PML patients. *J Infect Dis* 204, 237–244. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir256>
- Renner, K., Leger, H., Wegner, M., 1994. The POU domain protein Tst-1 and papovaviral large tumor antigen function synergistically to stimulate glia-specific gene expression of JC virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 6433–6437. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.14.6433>
- Richardson, E.P., 1961. Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. *N. Engl. J. Med.* 265, 815–823. <https://doi.org/10.1056/NEJM196110262651701>
- Roche, G., 2013. Pwo DNA Polymerase [WWW Document]. Version 15. URL <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Roche/Bulletin/1/pwopolrobul.pdf> (accessed 9.26.18).
- Romagnoli, L., Wollebo, H.S., Deshmane, S.L., Mukerjee, R., Del Valle, L., Safak, M., Khalili, K., White, M.K., 2009. Modulation of JC virus transcription by C/EBP β . *Virus Res.* 146, 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.09.005>
- Safak, M., Gallia, G.L., Khalili, K., 1999. A 23-bp sequence element from human neurotropic JC virus is responsive to NF-kappa B subunits. *Virology* 262, 178–189. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9886> [pii]
- Sariyer, I.K., Khalili, K., Safak, M., 2008. Dephosphorylation of JC virus agnoprotein by protein phosphatase 2A: Inhibition by small t antigen. *Virology* 375, 464–479. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.02.020>
- Schiller, J.T., Lowy, D.R., 2015. Raising expectations for subunit vaccine. *J. Infect. Dis.* 211, 1373–1375. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu648>
- Schowalter, R.M., Pastrana, D. V., Pumphrey, K.A., Moyer, A.L., Buck, C.B., 2010. Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin. *Cell Host Microbe* 7, 509–515. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.05.006>
- Schrödinger, L., 2015. The PyMol Molecular Graphics System, Versión 1.8. Thomas Hold. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Schwab, N., Ulzheimer, J.C., Fox, R.J., Schneider-Hohendorf, T., Kieseier, B.C., Monoranu, C.M., Staugaitis, S.M., Welch, W., Jilek, S., Du Pasquier, R.A., Brück, W., Toyka, K. V., Ransohoff, R.M., Wiendl, H., 2012. Fatal PML associated with efalizumab therapy Insights into integrin $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ in JC virus control. *Neurology* 78, 458–467. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182478d4b>
- Scuda, N., Hofmann, J., Calvignac-Spencer, S., Ruprecht, K., Liman, P., Kuhn, J., Hengel, H., Ehlers, B., 2011. A Novel Human Polyomavirus Closely Related to the African Green Monkey-Derived Lymphotropic Polyomavirus. *J. Virol.* 85, 4586–4590.

<https://doi.org/10.1128/JVI.02602-10>

- Shishido-Hara, Y., 2010. Progressive multifocal leukoencephalopathy and promyelocytic leukemia nuclear bodies: A review of clinical, neuropathological, and virological aspects of JC virus-induced demyelinating disease. *Acta Neuropathol.* 120, 403–417. <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0694-x>
- Shishido-Hara, Y., Ichinose, S., Higuchi, K., Hara, Y., Yasui, K., 2004. Major and minor capsid proteins of human polyomavirus JC cooperatively accumulate to nuclear domain 10 for assembly into virions. *J. Virol.* 78, 9890–9903. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.18.9890-9903.2004>
- Sinnecker, T., Hadisurya, J., Schneider-Hohendorf, T., Schwab, N., Wrede, K., Gembruch, O., Gold, R., Hellwig, K., Pilgram-Pastor, S., Adams, O., Albrecht, P., Hartung, H.-P., Aktas, O., Kraemer, M., 2019. Extensive immune reconstitution inflammatory syndrome in Fingolimod-associated PML: a case report with 7 Tesla MRI data. *BMC Neurol.* 19, 190. <https://doi.org/10.1186/s12883-019-1407-2>
- Smith, A.E., Lilie, H., Helenius, A., 2003. Ganglioside-dependent cell attachment and endocytosis of murine polyomavirus-like particles. *FEBS Lett.* 555, 199–203. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)01220-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01220-1)
- Sock, E., Renner, K., Feist, D., Leger, H., Wegner, M., 1996. Functional comparison of PML-type and archetype strains of JC virus. *J. Virol.* 70, 1512–1520.
- Söding, J., Biegert, A., Lupas, A.N., 2005. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Res.* W244-248. <https://doi.org/10.1093/nar/gki408>
- Sorensen, P.S., Bertolotto, A., Edan, G., Giovannoni, G., Gold, R., Havrdova, E., Kappos, L., Kieseier, B.C., Montalban, X., Olsson, T., 2012. Risk stratification for progressive multifocal leukoencephalopathy in patients treated with natalizumab. *Mult Scler* 18, 143–152. <https://doi.org/10.1177/1352458511435105>
- Sospedra, M., Schippling, S., Yousef, S., Jelcic, I., Bofill-Mas, S., Planas, R., Stellmann, J.-P., Demina, V., Cinque, P., Garcea, R., Croughs, T., Girones, R., Martin, R., 2014. Treating Progressive Multifocal Leukoencephalopathy With Interleukin 7 and Vaccination With JC Virus Capsid Protein VP1. *Clin. Infect. Dis.* 59, 1588–1592. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu682>
- Stehle, T., Gamblin, S.J., Yan, Y., Harrison, S.C., 1996. The structure of simian virus 40 refined at 3.1 Å resolution. *Structure* 4, 165–182. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(96\)00020-2](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(96)00020-2)
- Stoner, G.L., Jobes, D. V, Fernandez Cobo, M., Agostini, H.T., Chima, S.C., Ryschkewitsch, C.F., 2000. JC virus as a marker of human migration to the Americas. *Microbes Infect.* 2, 1905–1911.
- Ströh, L.J., Stehle, T., 2014. Glycan Engagement by Viruses: Receptor Switches and Specificity. *Annu. Rev. Virol.* 1, 285–306. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-031413-085417>
- Stuve, O., Marra, C.M., Bar-Or, A., Niino, M., Cravens, P.D., Cepok, S., Frohman, E.M., Phillips, J.T., Arendt, G., Jerome, K.R., Cook, L., Grand'Maison, F., Hemmer, B.,

- Monson, N.L., Racke, M.K., 2006. Altered CD4+/CD8+ T-cell ratios in cerebrospinal fluid of natalizumab-treated patients with multiple sclerosis. *Arch Neurol* 63, 1383–1387. <https://doi.org/10.1001/archneur.63.10.1383>
- Sugimoto, C., Hasegawa, M., Kato, A., Zheng, H.-Y., Ebihara, H., Taguchi, F., Kitamura, T., Yogo, Y., 2002. Evolution of Human Polyomavirus JC: Implications for the Population History of Humans. *J. Mol. Evol.* 54, 285–297. <https://doi.org/10.1007/s00239-001-0009-x>
- Sugimoto, C., Kitamura, T., Guo, J., Al-Ahdal, M.N., Shchelkunov, S.N., Otova, B., Ondrejka, P., Chollet, J.-Y., El-Safi, S., Ettayebi, M., Grésenguet, G., Kocagöz, T., Chaiyarasamee, S., Thant, K.Z., Thein, S., Moe, K., Kobayashi, N., Taguchi, F., Yogo, Y., 1997. Typing of urinary JC virus DNA offers a novel means of tracing human migrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 9191–9196. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.17.9191>
- Sunyaev, S.R., Lugovskoy, A., Simon, K., Gorelik, L., 2009. Adaptive mutations in the JC virus protein capsid are associated with progressive multifocal leukoencephalopathy (PML). *PLoS Genet* 5, e1000368. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000368>
- Suzuki, T., Orba, Y., Okada, Y., Sunden, Y., Kimura, T., Tanaka, S., Nagashima, K., Hall, W.W., Sawa, H., 2010. The human polyoma JC virus agnoprotein acts as a viroporin. *PLoS Pathog.* 6, e1000801. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000801>
- Tan, C.S., Ellis, L.C., Wuthrich, C., Ngo, L., Broge, T.A., Saint-Aubyn, J., Miller, J.S., Koralknik, I.J., 2010. JC Virus Latency in the Brain and Extraneural Organs of Patients with and without Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. *J. Virol.* 94, 9200–9209. <https://doi.org/10.1128/JVI.00609-10>
- Trowbridge, P.W., Frisque, R.J., 1995. Identification of three new JC virus proteins generated by alternative splicing of the early viral mRNA. *J. Neurovirol.* 1, 195–206. <https://doi.org/10.3109/13550289509113966>
- Tsai, B., Gilbert, J.M., Stehle, T., Lencer, W., Benjamin, T.L., Rapoport, T.A., 2003. Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40. *EMBO J.* 22, 4346–4355. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg439>
- Tsai, B., Qian, M., 2010. Cellular entry of polyomaviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 343, 177–194. <https://doi.org/10.1007/82-2010-38>
- Tyler, K.L., 2010. Progressive multifocal leukoencephalopathy: Can we reduce risk in patients receiving biological immunomodulatory therapies? *Ann. Neurol.* 68, 271–274. <https://doi.org/10.1002/ana.22185>
- Uhn, S.C., Morrone, S., Sablina, A.A., Arroyo, J.D., Hahn, W.C., Xu, W., 2007. Structural basis of PP2A inhibition by small t antigen. *PLoS Biol.* 5, e202. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050202>
- van der Meijden, E., Janssens, R.W.A., Lauber, C., Bavinck, J.N.B., Gorbalenya, A.E., Feltkamp, M.C.W., 2010. Discovery of a new human polyomavirus associated with Trichodysplasia Spinulosa in an immunocompromized patient. *PLoS Pathog.* 6, e1001024. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001024>
- Van Loy, T., Thys, K., Ryschkewitsch, C., Lagatie, O., Monaco, M.C., Major, E.O., Tritsmans, L., Stuyver, L.J., 2015. JC virus quasispecies analysis reveals a complex viral population

- underlying progressive multifocal leukoencephalopathy and supports viral dissemination via the hematogenous route. *J Virol* 89, 1340–1347. <https://doi.org/10.1128/JVI.02565-14>
- Vanchiere, J.A., Abudayyeh, S., Copeland, C.M., Lu, L.B., Graham, D.Y., Butel, J.S., 2009. Polyomavirus shedding in the stool of healthy adults. *J. Clin. Microbiol.* 47, 2388–2391. <https://doi.org/10.1128/JCM.02472-08>
- Vembar, S., Brodsky, J., 2008. One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 944–957. <https://doi.org/10.1038/nrm2546>
- Vermersch, P., Kappos, L., Gold, R., Foley, J.F., Olsson, T., Cadavid, D., Bozic, C., Richman, S., 2011. Clinical outcomes of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurology* 76, 1697–1704. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31821a446b>
- Volz-Zang, C., Keller-Stanislawski, B., (PEI), 2016. Aktualisierte Empfehlungen zur Minimierung des Risikos einer PML unter Tysabri®-Behandlung. *Bull. ZUR ARZNEIMITTELSICHERHEIT*, Informationen aus BfArM und PEI 11–20.
- Walker DL, F.R., 1986. The biology and molecular biology of JC virus., in: Salzman, N.P. (Ed.), *The Papovaviridae The Polyomaviruses*. Plenum Press: New York, pp. 327–377.
- Warnke, C., Von Geldern, G., Markwerth, P., Dehmel, T., Hoepner, R., Gold, R., Pawlita, M., Kümpfel, T., Mäurer, M., Stangel, M., Wegner, F., Hohlfeld, R., Straeten, V., Limmroth, V., Weber, T., Hermsen, D., Kleinschnitz, C., Hartung, H.P., Wattjes, M.P., Svenningsson, K., Major, E., Olsson, T., Kieseier, B.C., Adams, O., 2014. Cerebrospinal fluid JC virus antibody index for diagnosis of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *Ann. Neurol.* 76, 792–801. <https://doi.org/10.1002/ana.24153>
- White, M.K., Safak, M., Khalili, K., 2009. Regulation of Gene Expression in Primate Polyomaviruses. *J. Virol.* 83, 10846–10856. <https://doi.org/10.1128/JVI.00542-09>
- Williamson, E.M., Berger, J.R., 2015. Infection risk in patients on multiple sclerosis therapeutics. *CNS Drugs* 29, 229–244. <https://doi.org/10.1007/s40263-015-0226-2>
- Wollebo, H.S., White, M.K., Gordon, J., Berger, J.R., Khalili, K., 2015. Persistence and pathogenesis of the neurotropic polyomavirus JC. *Ann. Neurol.* 77, 560–570. <https://doi.org/10.1002/ana.24371>
- Wortman, M.J., Lundberg, P.S., Dagdanova, A. V., Venkataraman, P., Daniel, D.C., Johnson, E.M., 2016. Opportunistic DNA Recombination with Epstein-Barr Virus at Sites of Control Region Rearrangements Mediating JC Virus Neurovirulence. *J. Infect. Dis.* 213, 1436–1443. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv755>
- Yogo, Y., Iida, T., Taguchi, F., Kitamura, T., Aso, Y., 1991. Typing of human polyomavirus JC virus on the basis of restriction fragment length polymorphisms. *J Clin Microbiol* 29, 2130–2138.
- Yogo, Y., Kitamura, T., Sugimoto, C., Ueki, T., Aso, Y., Hara, K., Taguchi, F., 1990. Isolation of a possible archetypal JC virus DNA sequence from nonimmunocompromised individuals. *J Virol* 64, 3139–3143.
- Yogo, Y., Sugimoto, C., Zheng, H.-Y., Ikegaya, H., Takasaka, T., Kitamura, T., 2004. JC virus

- genotyping offers a new paradigm in the study of human populations. *Rev. Med. Virol.* 14, 179–191. <https://doi.org/10.1002/rmv.428>
- Yukitake, M., 2018. Drug-induced progressive multifocal leukoencephalopathy in multiple sclerosis: a comprehensive review. *Clin. Exp. Neuroimmunol.* 9, 37–47.
- Zaheer, F., Berger, J.R., 2012. Treatment-related progressive multifocal leukoencephalopathy: Current understanding and future steps. *Ther. Adv. Drug Saf.* 3, 227–239. <https://doi.org/10.1177/2042098612453849>
- Zheng, H.Y., Takasaka, T., Noda, K., Kanazawa, A., Mori, H., Kaburi, T., Joh, K., Oh-Ishi, T., Ikegaya, H., Nagashima, K., Hall, W.W., Kitamura, T., Yogo, Y., 2005. New sequence polymorphisms in the outer loops of the JC polyomavirus major capsid protein (VP1) possibly associated with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Gen. Virol.* 86, 2035–2045. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80863-0>

6. Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin - Assistenzärztin im Institut für Virologie- UKD. Am Zustandekommen dieser Arbeit waren viele Menschen direkt und indirekt beteiligt, wofür ich Ihnen an dieser Stelle ganz herzlich danken möchte.

An erster Stelle möchte ich meinen Doktorvater, Herrn Prof Dr. med. Ortwin Adams nennen. Zu jeder Zeit war er für mich da, hat sich stets für meine Facharztausbildung, sowie für meinen wissenschaftlichen Werdegang gekümmert. Für seine fachliche und menschliche Betreuung bin ich von Herzen dankbar.

Großer Dank gebührt auch meinem zweiten Betreuer Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Clemens Warnke für seine kompetente wissenschaftliche Betreuung und Hilfsbereitschaft.

Ebenso dankbar bin ich bei meinem ehemaligen Chef, Herrn Prof. Dr. med. Jörg Timm für seine positive Einstellung und seine aufmerksame Unterstützung.

Mein außerordentlicher Dank gilt Herrn Dr. med. Sebastian Grund für unsere hervorragende Mitarbeit und Freundschaft durch die Jahre.

Ein großes Dankeschön für die freundschaftliche Zusammenarbeit am Institut und die Unterstützung vor Ort gilt Herrn Prof. Dr. med. Ingo Drexler.

Ich danke außerdem Herrn Prof. Dr. med. Colin Mackenzie im Institut für Mikrobiologie für sein Interesse an meinen Werdegang. Seine fachliche Kompetenz und unsere interessanten Unterhaltungen haben mich sehr inspiriert.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. Nadine Lübke, Herrn Dr. Andreas Walker, Frau Christiane Cramer und allen wissenschaftlichen Mitarbeitern der Virologie- und der Mikrobiologie-Laborgemeinschaft von UKD. Ferner möchte ich die Technischen Assistentinnen der Klinischen Virologie insbesondere: Frau A.Rausch, Frau J.Camdereli, Frau N.Menke, Frau B.Cohen, Frau I.Herrmann, Frau P.Hülsberg, Frau S.Höveler, Frau M.Poschmann, Frau I.Rachdi, Frau U.Rotthues, Frau S.Scherger, Frau A.Christ für ihre freundliche, offene Arbeitsatmosphäre und für meine Einarbeitung in den Laboralltag herzlich danken.

Abschließend möchte ich mich natürlich noch ganz herzlich bei meiner gesamten Familie bedanken, besonders aber bei meiner Mutter, die an mich immer geglaubt und meine Ausbildung und mein Studium in Biologie und anschließend in Medizin ermöglicht hat, sowie meinem Vater der mich immer unterstützt hat und für mich nur das Beste wollte.