

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

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

Marker zur Risikovorhersage und Diagnose von Fällen der
Natalizumab-assoziierten Progressiven Multifokalen
Leukenzephalopathie (PML)

Dissertation

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

vorgelegt von

Pia Frenken

2020

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Pro. Dr. med. Ortwin Adams

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Philipp Albrecht

Nobody said it was easy

No one ever said it would be this hard

Oh, take me back to the start

The Scientist, Coldplay

Zusammenfassung

Die Progressive Multifokale Leukenzephalopathie (PML) ist eine opportunistische Infektion des Gehirns, hervorgerufen durch das JC Polyomavirus (JCPyV). Hierbei ist die Immunsuppression Voraussetzung für die Reaktivierung des im Körper des Wirts persistierenden Virus. Besondere Aufmerksamkeit wurde der PML insbesondere ab 2005 zuteil, als diese Erkrankung erstmalig bei drei Patienten auftrat, die mit dem selektiven Immunsuppressivum Natalizumab behandelt wurden. Bis zum 7. März 2019 wurden 814 Natalizumab-assoziierte PML Fälle gemeldet. Eine kausale Therapie der PML existiert bis dato nicht und die Morbidität und die Letalität sind hoch. Die frühzeitige Diagnosestellung ist wichtig, um nach Möglichkeit sowohl den Immunstatus als auch damit die Prognose zu verbessern.

In der vorliegenden Arbeit wurde im ersten, experimentellen Teil die Assoziation des Blutgruppen ABO-Systems mit dem PML Risiko untersucht. Dazu wurden Serumproben von PML-Patienten und MS-Patienten ohne PML auf ihre Blutgruppe getestet und die Häufigkeiten miteinander verglichen. Außerdem wurden Antikörperlevel gegen JCPyV nach Zugehörigkeit der Blutgruppe miteinander verglichen, da höhere Antikörperlevel gegen JCPyV mit einem höheren Risiko für die Entwicklung einer PML assoziieren.

In einem zweiten, statistischen Teil der Arbeit wurden Antikörperlevel in Serum und Liquor sowie der Liquor-Anti-JCPyV-Antikörper-Index (ASI_{JCPyV}), welcher für eine intrathekale Synthese von virusspezifischen Antikörpern spricht, insbesondere bei Patienten mit initial negativer oder niedrig-positiver Liquor-JCPyV-PCR betrachtet, um zu ermitteln, ob die Serologie und der ASI_{JCPyV} einen zusätzlichen diagnostischen Wert für die PML aufweisen. Klinische Daten waren hierbei über eine Abfrage an das Paul-Ehrlich-Institut von Fällen von Natalizumab-assoziiierter PML in Deutschland verfügbar und wurden mit Daten aus dem Institut für Virologie in Düsseldorf zusammengeführt.

Im ersten Teil der Arbeit zeigte sich ein Trend, dass die Blutgruppe 0 unter PML-Patienten überrepräsentiert sein könnte (Anteil Blutgruppe 0 in der PML-Patientengruppe 46,8%, in der Kontrollgruppe 35,9%), besonders deutlich für Fälle von Natalizumab-assoziiierter PML (Blutgruppe 0 hier bei 59,3%). Zudem wiesen die Patienten mit Blutgruppe 0 signifikant höhere Antikörperlevel gegen JCPyV auf als die Patienten mit anderen Blutgruppen (medianer Serum AU 121 bei Blutgruppe 0 gegenüber einem medianen Serum AU von 56 bei allen anderen Blutgruppen, $p = 0,005$).

Im zweiten Teil der Arbeit konnte für 36 Fälle von Natalizumab-assoziiierter PML serologische Daten am Institut für Virologie ermittelt werden. Die detaillierte Untersuchung insbesondere der Fälle, die initial eine negative oder niedrig-positive Liquor-JCPyV-PCR aufwiesen ($n=17$) zeigte, dass es im Verlauf zum Anstieg von JCPyV-spezifischen Antikörperantworten in Blut (Faktor 3,39) und Liquor (Faktor 40,3) kommt. Daten zum ASI_{JCPyV} waren nur sehr begrenzt ($n=10$) verfügbar, erbrachten jedoch in 7 von 10 Fällen den positiven Nachweis einer intrathekalen, virusspezifischen Antikörpersynthese.

Insgesamt bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit zwei in der Literatur bereits diskutierte, bislang jedoch unzureichend untersuchte Aspekte der PML-Forschung: zum Einen scheint das ABO-Blutgruppensystem mit dem Risiko für die Entwicklung einer PML assoziiert zu sein, so dass Individuen der Blutgruppe 0 möglicherweise ein leicht höheres Risiko für die Entwicklung einer PML aufweisen als Individuen anderer Blutgruppen. Zum anderen bestätigen die serologischen Untersuchungen anhand der an das PEI berichteten Fälle von PML in Deutschland bisherige Untersuchungen, wonach insbesondere dem Nachweis einer intrathekalen Synthese gegen JCPyV ein möglicher zusätzlicher diagnostischer Wert bei Verdacht auf PML zukommen könnte.

Summary

The Progressive Multifocal Leucoencephalopathy is a lytic and opportunistic infection of the brain caused by JC Polyomavirus (JCPyV). Immunosuppression is required to cause a reactivation of the virus which is persisting in the hosts body. Interest in PML increased after three MS-Patients treated with the selective immunosuppressant Natalizumab developed PML for the first time in 2005. Up until 7th March 2019 814 cases of Natalizumab-associated PML have been reported. There is no causal therapy to treat PML to this day and morbidity as well as lethality are still high. The early detection and diagnosis of PML are important to improve immune status and prognosis.

The first experimental part of this dissertation studied the association between the AB0 blood type and PML risk. Samples of serum were tested for their blood type in patients with PML and in MS-patients without PML. Then the prevalence of blood types was compared. Furthermore, antibodylevels against JCPyV were compared according to blood type since higher antibodylevels associate with a higher risk of PML.

A second statistical part examined antibodylevels in serum and liquor as well as the Liquor-Anti-JCPyV-Antibody-Index (ASI_{JCPyV}) which determines the intrathecal synthesis of virus specific antibodies to determine whether those parameters have additional diagnostic value in PML diagnosis. Clinical data of German Natalizumab-associated-PML cases was obtained from the Paul-Ehrlich-Institute and matched with serological data available at the Virological Institute Düsseldorf.

The first part showed a trend that blood type 0 may be overrepresented in patients with PML (46,8% Type 0 in PML Patients, 35,9% in Control) particularly in those patients with Natalizumab-associated-PML (59,3% Blood Type 0). Furthermore, patients with blood type 0 presented significantly higher antibody levels against JCPyV than patients of all other blood types (median serum AU 121 in blood type 0 versus 56 in all other blood types combined, $p=0,005$).

In the second part 36 cases of Natalizumab-associated-PML could be matched with serological data. A detailed examination of 17 cases with negative or low-posititve initial liquor-JCPyV-PCR showed an increase in antibodylevels against JCPyV in serum (Factor 3,39) and liquor (Factor 40,3). ASI_{JCPyV} could be determined in 10 cases and showed evidence of intrathecal synthesis of virus specific antibodies in 7 of 10 cases.

All things considered our results confirm two aspects that have already been discussed in literature but have been examined inadequately. AB0 Blood type seems to be a risk factor for the development of PML that is blood type 0 associates with an increased risk of PML than individuals with other blood types. On the other hand, our examinations show that antibodylevels and in particular the detection of intrathecal synthesis of JCPyV virus specific antibodies may provide additional certainty in the diagnosis of PML.

Liste der verwendeten Abkürzungen

AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
ASI _{JCPyV}	Anti-JCPyV-Antikörper Index
ART	Antiretrovirale Therapie
AU	Arbitrary Units
BKPyV	BK Polyomavirus
DMSG	Deutsche Multiple Sklerose Gesellschaft
EDSS	Extended Disability Status Scale
EVGR	early viral gene region
EIA	enzyme immunoassay
FLAIR	fluid attenuated inversion recovery
HAART	highly active antiretroviral therapy
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IU	International Units
JCPyV	JC Polyomavirus
KI	Konfidenzintervall
KIS	Klinisch isoliertes Syndrom
KMT	Knochenmarktransplantation
KM	Kontrastmittel
LVGR	late viral gene region
MHC	Major Histocompatibility Complex
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
OR	Odds-Ratio
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PML	Progressive Multifokale Leukenzephalopathie
PPMS	primäre progrediente MS
RRMS	schubförmig remittierende MS (Relapsing remitting MS)
SPMS	sekundäre progrediente MS

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Multiple Sklerose	1
1.1.1.	Definition	1
1.1.2.	Pathogenese	1
1.1.3.	Ätiologie	2
1.1.4.	Subtypen / Verlaufsformen	4
1.1.5.	Symptome	5
1.1.6.	Diagnose	5
1.1.7.	Therapie	6
1.1.8.	Prognose	7
1.2.	Polyomaviren	8
1.2.1.	Aufbau	10
1.3.	JCPy-Virus	10
1.4.	Progressive Multifokale Leukenzephalopathie	11
1.4.1.	Symptome	12
1.4.2.	Diagnostik	13
1.4.3.	Therapie	15
1.4.4.	Prognose	16
1.4.5.	Meldung von Natalizumab-assoziierten Fällen von PML an das Paul-Ehrlich-Institut	17
1.5.	Natalizumab	17
1.6.	Blutgruppensystem nach AB0	21
2.	Fragestellung	23
3.	Material und Methoden	24
3.1.	Patientenproben und Patientendaten	24
3.2.	Patientencharakteristika	24
3.2.1.	Patientenkollektiv, in dem die Blutgruppenbestimmung erfolgte	24

3.2.2.	Patientenkollektiv (PEI-Kollektiv), welches mit Daten der serologischen Antikörper Diagnostik zusammengeführt wurde	25
3.3.	Methodik der Blutgruppenbestimmung	26
3.3.1.	Material.....	26
3.3.2.	Prinzip der ABO-Bestimmung	26
3.3.3.	Durchführung der ABO-Bestimmung	28
3.4.	Statistik	29
4.	Ergebnisse.....	30
4.1.	Das AB0-System und die Assoziation mit dem PML-Risiko.....	30
4.1.1.	Basischarakteristika der Patienten, bei denen eine Bestimmung der Blutgruppe erfolgte.....	30
4.1.2.	Blutgruppenverteilung in der PML- und Kontrollgruppe	30
4.1.3.	Blutgruppenverteilung in der Natalizumab-PML-Subgruppe im Vergleich zur MS-Kontrollgruppe	31
4.1.4.	Assoziation von Anti-JCPyV- und Anti-BKPyV-Antikörperlevel mit dem ABO-Blutgruppensystem	32
4.2.	Serologische Antikörper-Diagnostik in vom Paul-Ehrlich-Institut gemeldeten deutschen Fällen von Natalizumab-assoziiertes PML	36
4.2.1.	Longitudinale Betrachtung von Patienten mit in der ersten JCPyV-PCR aus dem Liquor negativen oder niedrig positiven Befunden	39
5.	Diskussion	44
5.1.	Assoziation des AB0-Blutgruppen-Systems mit PML	44
5.1.1.	Zusammensetzung der Blutgruppen	44
5.1.2.	Assoziation des AB0-Blutgruppensystems mit der Subgruppe der Natalizumab-PML Patienten	47
5.1.3.	Assoziation des AB0 Blutgruppensystems mit anti-JCPyV-Antikörperantworten.....	49
5.1.4.	Assoziation des ABO-Blutgruppen-Systems mit der anti-BKPyV Serologie.....	51
5.2.	Die Bedeutung der Polyomavirus-Serologie für deutsche Fälle Natalizumab-assoziiertes PML gemeldet an das Paul-Ehrlich-Institut	52

VI

5.2.1. Serum-AU Werte der anti-JCPyV-Serologie bei Fällen von PML aus Deutschland	54
5.2.2. Liquor-AU Werte der anti-JCPyV-Serologie bei Fällen von PML aus Deutschland	55
5.2.3. ASI _{JCPyV} Verläufe der anti-JCPyV-Serologie bei Fällen von PML aus Deutschland	56
5.3. Limitationen der Arbeit	58
6. Schlussfolgerung	60
7. Literaturverzeichnis	61

1. Einleitung

1.1. Multiple Sklerose

1.1.1. Definition

Die Multiple Sklerose (MS), auch Enzephalomyelitis disseminata genannt, ist eine chronisch entzündliche Erkrankung und die häufigste immun vermittelte demyelinisierende Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS) [1]. Betroffen sind hierbei die meist myelinisierten Nervenzellen von Gehirn und Rückenmark.[2] Klassischerweise ist die MS als eine Erkrankung der weißen Substanz definiert, neuere Studien zeigen jedoch, dass es auch frühzeitig zu einer Mitbeteiligung der grauen Substanz kommen kann und dass eine anhaltende neurologische Behinderung häufig vor allem auch durch Schädigungen in der grauen Substanz erklärt werden kann [3].

1.1.2. Pathogenese

Die MS ist als erworbene chronisch-entzündliche Erkrankung definiert, bei der fehlgesteuerte autoreaktive Immunzellen gegen die Zelloberfläche der Myelinscheiden und Axone gerichtet sind. Hierbei ist sowohl das angeborene Immunsystem mit Zellen wie den Makrophagen beteiligt, als auch das erworbene System mit autoreaktiven T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Antikörpern. Ein komplexes Zusammenspiel dieser Systeme sorgt bei MS Patienten für die Migration der Entzündungszellen durch die Blut-Hirn-Schranke und führt zur Schädigung der Zielstrukturen im ZNS [4, 5]. Bei Schädigung der grauen Substanz gibt es Hinweise für das Auftreten von meningealen B-Zell-Lymphfollikeln, welche Entzündungsmediatoren ausschütten und Makrophagen aktivieren und so zu fokalen Schädigungen der grauen Substanz führen [3]. Die drei pathologischen Hauptmechanismen der MS sind Entzündung, Demyelinisierung [6] und axonaler Schaden. Hierdurch kommt es zu einer Unterbrechung der neuronalen Signalübermittlung [7]. Während es durch die Regenerationsfähigkeit der Oligodendrozyten zu einer partiellen Remyelinisierung kommen kann, sind die Schäden bei Axonopathien in der Regel irreversibel [8]. Durch eine reaktive Gliose (durch Astrozyten) kommt es kompensatorisch zu den teils konfluierenden Vernarbungen [9]. Betroffen sind vor allem die Regionen des Nervus opticus, des juxtakortikalen und periventriculären Marklagers, des Hirnstammes, des Kleinhirns und des Rückenmarks [10].

Die MS manifestiert sich in der Regel im jungen Erwachsenenalter. Das mittlere Erkrankungsalter liegt zwischen 20 und 40 Jahren. Frauen sind deutlich häufiger betroffen als Männer, wobei das Geschlechterverhältnis von Frauen zu Männern aktuell bei ungefähr 2-3:1 (Stand 2016) liegt [11].

1.1.3. Ätiologie

Die genaue Ätiologie für die oben beschriebene Autoreaktivität des Immunsystems ist bis heute nicht ausreichend geklärt [12]. Es handelt sich bei der MS um ein komplexes Krankheitsbild, bei dem genetische Faktoren mit verschiedenen Umweltfaktoren und zufälligen Faktoren zusammenwirken. Einige dieser Faktoren werden im Folgenden beschrieben.

In Zwillingsstudien zeigte sich bei monozygoten Zwillingen ein deutlich erhöhtes Risiko des Zwillings, an MS zu erkranken, wenn der andere Zwilling bereits erkrankt ist. Dieses Risiko war mit 30% deutlich höher als bei normalen Geschwistern. Bei dizygoten Zwillingen liegt dieses Risiko bei etwa 5% [2, 13]. Dies ist ähnlich hoch, wie bei Geschwistern [14]. In einer dänischen Studie wurde ein durchschnittliches zusätzliches Risiko für Verwandte 1. Grades (Geschwister (5%), Eltern (2%), Kinder (2%)) eines MS Erkrankten von 2,5% berechnet [2]. Dieses Risiko muss mit dem sporadischen Risiko addiert werden, welches jeder Mensch hat und welches bei etwa 0,1% liegt [15]. Im Hinblick auf genetische Faktoren gibt es über 230 genetische Polymorphismen [16], bei denen eine Beteiligung an der Entstehung der MS diskutiert wird. Bei den assoziierten Genen handelt es sich ganz überwiegend um Gene des Immunsystems [5], wobei der stärkste Zusammenhang dem HLA-DRB1 Gen und dem HLA-A2 Gen, beides MHC Gene (major histocompatibility complex), zugeschrieben wird [17, 18]. Weitere Gene, die eine Rolle in der Heredität der MS spielen, sind sogenannte Low-Frequency-Variationen in Genen, die zum Beispiel für die T-Zell-Regulation und die Homöostase, den NFκB- oder IFNγ-Signalweg verantwortlich sind [19]. Liegt eine solche Variation, zumeist eine Missense-Variation, vor, ist das MS-Risiko erhöht.

Die Umweltfaktoren spielen ebenfalls eine große Rolle für die Entwicklung der MS und können mit genetischen Faktoren interagieren, sodass sich die verschiedenen Faktoren nicht einfach addieren. Einige dieser Faktoren sind nachfolgend aufgeführt. Der geographische Breitengrad und Geburtsort scheinen einen Einfluss auf das Risiko, eine MS zu entwickeln, zu haben. Eine hohe Prävalenz von MS liegt vor allem in nördlichen Regionen wie Europa, Russland und Nordamerika vor, jedoch auch in Ländern wie Australien und Neuseeland

[20]. Auch innerhalb dieser Länder scheint das MS Risiko höher zu sein, je weiter man nach Norden geht (nördlichere Breitengrade). In südlicheren Breitengraden eines solchen Landes ist das Risiko für MS hingegen niedriger [21]. Auch auf der Südhalbkugel kann in manchen Regionen ein ähnliches Phänomen beobachtet werden. So ist die Inzidenz von MS in südlicheren Teilen Australiens höher als in nördlichen Teilen Australiens. Dies kann jedoch nicht auf alle Regionen der Südhalbkugel reproduziert werden, zumal aktuell weniger Daten aus diesen Regionen vorliegen [22]. Ein weiterer, bereits seit vielen Jahren diskutierter Risikofaktor für die Entwicklung einer MS, ist der Einfluss von Viren [23]. Im Fokus stehen hier verschiedene Viren, wie zum Beispiel diverse Herpesviren, humane endogene Retroviren und Rubellaviren, gegen welche unter anderem auch IgG-Antikörper im Liquor nachgewiesen werden können, was unter anderem auch in der Diagnostik der MS verwendet wird [24]. Ein Virus, welches besonders häufig mit der MS assoziiert wird, ist das Epstein Barr Virus (EBV), da nahezu jeder MS Patient eine positive Serologie, das heißt, eine stattgehabte EBV-Infektion aufweist. Die Durchseuchung in der Bevölkerung liegt dagegen bei 90-95% [1]. In verschiedenen Studien werden dem Vitamin-D Spiegel im Blut, unter anderem auch mit der einhergehenden UV-Strahlung (UV-Strahlung ist essentiell in der natürlichen Vitamin-D Synthese des menschlichen Körpers), zum einen eine Risikoreduktion bei der Entwicklung einer MS zugeschrieben [25] und zum anderen eine protektive Wirkung bei einer bereits bestehenden MS [26, 27]. Niedrige Vitamin-D Spiegel im Blut sind hingegen mit einem erhöhten Risiko, eine MS zu entwickeln, assoziiert [1]. Ein erhöhter BMI im Kindes- oder Jugendalter (bis zum 20. Lebensjahr) ist ebenfalls mit einem erhöhten MS-Risiko behaftet [28]. Das Rauchen von Tabak ist mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer MS assoziiert. Kettenraucher haben im Vergleich zu Nichtrauchern ein erhöhtes Risiko. Zusätzlich deuten epidemiologische Studien darauf hin, dass das Risiko für eine Progression der MS in eine sekundär progrediente MS durch jedes zusätzliche fortgeführte Jahr des Rauchens im Vergleich zu Patienten, die bei Diagnose aufhören zu rauchen, um 4,7% pro Jahr erhöht [29, 30]. Ein Beispiel von Interaktion von Genen und Umwelt ist das Zusammenspiel von HLA-DRB1-15, der Abwesenheit von HLA-A-02 und dem Rauchen in einer skandinavischen Kohorte. Das Risiko, eine MS zu entwickeln ist hier 13-fach (OR 12,7) erhöht, wenn die Patienten HLA-DRB1-15 aufweisen, nicht HLA-A-02 Träger und zusätzlich Raucher sind im Vergleich zu Patienten, die nicht rauchen und keine der HLA-spezifischen Risikofaktoren haben [31]. Die Risikofaktoren in Kombination scheinen also ein potenziertes Risiko zu haben.

1.1.4. Subtypen / Verlaufsformen

Die folgenden drei Verlaufsformen der MS können voneinander unterschieden werden [32, 33]:

- Schubförmig-remittierende MS (Relapsing-remitting MS, RRMS)
- Sekundär chronisch-progrediente MS (SPMS)
- Primär progrediente MS (PPMS)

Definiert werden die verschiedenen Subtypen über den Verlauf der Erkrankung. Die Erkrankung beginnt in der überwiegenden Zahl der Fälle (ca. 90%) als RRMS, bei der es zwischen den Schüben zu symptomfreien Intervallen (Remission) mit klinischer Besserung kommt [34], und geht unbehandelt in ca. 50% der Fälle nach 10 Jahren und in ca. 90% der Fälle nach 20-25 Jahren in eine SPMS über [35], bei der es zu keiner vollständigen Remission mehr kommt [36]. Davon lässt sich die PPMS abgrenzen, bei der es zumeist zu einer von Anbeginn chronisch-progredienten Gangstörung kommt. Diese liegt bei ca. 10% der Patienten vor [37]. Die Krankheitsaktivität wird anhand der Anzahl der Schübe beziehungsweise der jährlichen Schubrate gemessen, sowie anhand von Surrogat Markern der Krankheitsaktivität im MRT (Zahl der neuen/sich vergrößernden T2-Läsionen, Zahl der Gadolinium-aufnehmenden Läsionen, in Studien auch Hirnatrophie) [38]. Als klinisch isoliertes Syndrom (KIS) wird die erste Episode (subjektive klinische Einschränkung oder objektivierbare Symptome des Patienten) bezeichnet, welche für eine entzündliche demyelinisierende Erkrankung des ZNS sprechen und mindestens 24 Stunden bestehen müssen. Da die Diagnosekriterien der MS inzwischen aufgrund verbesserter Zusatzdiagnostik häufig die Diagnose der MS bereits nach der ersten klinischen Episode erlauben, entspricht das KIS oft dem ersten MS-Schub und das KIS als eigenständige Behandlungsdiagnosen verliert zunehmend an Bedeutung [39].

Als Schub wird eine mindestens 24 Stunden bestehende, subjektiv durch den Patienten empfundene oder auch objektivierbare klinische Situation bezeichnet, bei der es zu neu aufgetretenen neurologischen Symptomen oder zu einer Verschlechterung von bereits bestehenden neurologischen Symptomen kommt, welche mit einem entzündlich demyelinisierenden Prozess korrelieren. Es müssen mindestens 30 Tage zwischen einem vorhergegangenen Schub und den aktuellen Symptomen liegen, damit diese als neuer Schub definiert werden können. Der Patient darf zu diesem Zeitpunkt keine erhöhte Körpertemperatur (Uthoff Phänomen) oder eine Infektion aufweisen [33, 40].

1.1.5. Symptome

Die Symptome der MS sind variabel und stark abhängig von der Lokalisation der Entzündungsherde. Die MS zeigt sich initial meist schubartig und monosymptomatisch. Häufig ist eines der ersten Symptome eine meist einseitige Optikusneuritis (im Rahmen einer Demyelinisierung des Nervus opticus) oder eine Sensibilitätsstörung (Hypästhesie, Dysästhesie, neuralgieformen Schmerzen) [40]. Im Rahmen von Entzündungen des Rückenmarks kann das sogenannte Lhermitte-Zeichen auftreten, ein elektrisierendes Gefühl in Armen, Rumpf und Beinen beim Beugen des Kopfes auf die Brust [41]. Daneben kann es aber auch zu erhöhten körperlichen und psychischen Erschöpfbarkeit (Fatigue) und neuropsychiatrischen Symptomen wie Depression, kognitiven Einschränkungen und Persönlichkeitsveränderung kommen [40, 42]. Weitere MS-Symptome sind vielfältig und reichen von Schmerzen [43], über motorische Störungen, das zerebelläre Syndrom bis hin zu kognitiven Einschränkungen [44], psychiatrischen [45] und vegetativen Störungen [46].

1.1.6. Diagnose

Die Diagnose der MS wird nach den sog. McDonald-Kriterien gestellt. Diese wurden erstmals 2001 verfasst und zuletzt im Jahr 2017 revidiert. Sie dienen sehr wesentlich dazu, die Diagnose der MS heute sehr frühzeitig, oft schon nach dem ersten Schub, stellen zu können, um dann auch eine frühzeitige Behandlung zu ermöglichen [39]. Voraussetzung für die Diagnose der schubförmigen MS sind demnach zunächst Symptome im Rahmen eines KIS (siehe Verlaufsformen). Die MS ist dabei eine Ausschlussdiagnose, die Symptome dürfen also durch nichts besser erklärt werden als die MS. Zudem muss der Nachweis einer chronischen Erkrankung des ZNS an verschiedenen Stellen (sog. räumliche Dissemination) zu verschiedenen Zeiten (zeitliche Dissemination) erbracht werden. Letzteres kann klinisch durch weitere Schubereignisse, die unterschiedlichen Stellen im ZNS betreffen, erbracht werden, schneller jedoch oft mit Hilfe der Zusatzdiagnostik. Wichtige Elemente der Zusatzdiagnostik sind zum Ausschluss von alternativen Diagnosen Laboruntersuchungen, zum frühzeitigen Nachweis der Dissemination in Ort und Zeit die Liquordiagnostik sowie die Befunde des MRTs [39].

Häufig gelingt es so heute, bereits nach dem ersten Symptom der MS, dem KIS, die Diagnose der MS zu stellen. Die räumliche Dissemination im MRT gilt als erfüllt, wenn mindestens eine typische Läsion an mindestens zwei der vier verschiedenen MS-typischen Lokalisationen des ZNS (periventrikulär, kortikal/juxtakortikal, infratentoriell oder spinal)

nachweisbar ist [39]. Die zeitliche Dissemination liegt vor, wenn Gadolinium-anreichernde und nicht-anreichernde Läsionen in einem MRT nebeneinander vorliegen oder sich in einem Verlaufs-MRT im Vergleich zu einer Vor-MRT neue MS-typische Läsionen zeigen [39]. Alternativ oder ergänzend gilt auch der isolierte Nachweis von oligoklonalen Banden (OKB) im Liquor als Nachweis der zeitlichen Dissemination [39]. Die OKB sind intrathekal produzierte IgG-Antikörper und können über eine isoelektrische Fokussierung nachgewiesen werden. Wichtig ist hierbei der Vergleich der Banden von Serum und Liquor. OKB, die nur im Liquor, aber nicht im Serum nachgewiesen werden können, sprechen für eine intrathekale Synthese von Immunglobulinen und somit für eine chronische Entzündung des ZNS. Die OKB liegen bei etwa 88% der MS Patienten und bei 69% der Patienten mit KIS vor [47]. Zusätzlich kann bei vielen MS Patienten (ca. 80%) eine positive MRZ-Reaktion (Nachweis einer intrathekalen Synthese von Antikörpern gegen Masern (M), Röteln (R), und Varizella Zoster (Z)) nachgewiesen werden, die die Diagnose der MS weiter stützen kann, obgleich diese Methodik nicht Teil der internationalen Diagnosekriterien ist [48]. Im Test zum Nachweis der intrathekalen Synthese im Sinne einer positiven MRZ-Reaktion müssen erhöhte intrathekale Antikörper gegen mindestens zwei der drei oben genannten Viren nachgewiesen werden. Berechnet wird die MRZ-Reaktion, modifiziert nach dem Schema von Reiber et. al. [49], wobei Gesamt-IgG- und Albuminwerte aus Serum und Liquor, sowie die Antikörperlevel der drei Viren zur Berechnung hinzugezogen werden. Dies gelingt bei MS-Patienten in knapp 80% der Fälle (im Vergleich nur bei ca. 3% der gesunden Patienten), somit ist der Test mit einer Spezifität von bis zu 97% hochspezifisch [50].

1.1.7. Therapie

Die Therapie der MS umfasst drei Bereiche. Die Symptomkontrolle, die Therapie der akuten Schübe und die Schub-/Progressionsprophylaxe. Eine Heilung der MS ist bisher nicht möglich. Die Symptomkontrolle ist abhängig von den beim Patienten vorliegenden Beschwerden. Viele der Beschwerden können über medikamentöse Therapien oder ein multimodales Vorgehen wie Physiotherapie, Ergotherapie, Logopädie etc. gelindert werden [32]. In der Therapie eines akuten Schubes werden vor allem hochdosierte Glucocorticoide verwendet. Diese werden über einen Zeitraum von 3-5 Tagen hochdosierte (zum Beispiel: Methylprednisolon 500-1000mg) intravenös verabreicht oder oral eingenommen [51]. Bei schlechtem Ansprechen auf Glucocorticoide können außerdem eine Plasmaseparation oder eine Immunadsorption durchgeführt werden [52]. Die akute Therapie eines Schubes hat

jedoch keinen nachgewiesenen Einfluss auf die Zeit bis zu einem erneuten Schub. Hierzu wird eine krankheitsmodifizierende Therapie benötigt.

Eine krankheits- oder verlaufsmodifizierende Therapie hat mehrere Ziele, nämlich die Reduktion der Schubfrequenz (bei der RRMS) und eine Verzögerung der Progression der Krankheit (Übergang RRMS in SPMS oder Progression innerhalb der SPMS bzw. PPMS). Zunehmend werden auch Endpunkte in post-hoc Analysen klinischer Studien erprobt, die das multimodale Fehlen von Krankheitsaktivität untersuchen (sog. „no evidence of disease activity“ (NEDA)) [53, 54]. Das größte Spektrum an Medikamenten liegt zur Behandlung der RRMS vor. Die Medikamente haben unterschiedlichste Wirkweisen und sind entweder immunsuppressiv oder immunmodulatorisch wirksam. Zu den Immunmodulatoren zählen vor allem die älteren Injektionstherapeutika (Gruppe der β -Interferone und Glatirameracetat), während orale Therapeutika (Dimethylfumarat, Cladribin, Fingolimod, Teriflunomid) und Infusionstherapeutika (Mitoxantron, moderne monoklonale Antikörper wie Natalizumab, Alemtuzumab oder Ocrelizumab [55, 56]) immunsuppressives Potential aufweisen und daher mit erhöhten Risiken für infektiöse Komplikationen oder auch Malignomentwicklung verbunden sind.

1.1.8. Prognose

Ein Teil (etwa 15%) der Patienten mit einem einmaligen demyelinisierenden Ereignis im Sinne eines KIS erlebt keinen zweiten Schub, wobei räumlich disseminierte Läsionen in der MRT und/oder der Nachweis von oligoklonalen Banden im Liquor das Risiko für ein zweites Ereignis jeweils erhöhen. Vor allem Patienten mit einer initial geringen Einschränkung (EDSS < 2) und einer langen Krankheitsdauer haben ein geringes Risiko (ca. 10%), überhaupt eine signifikante Einschränkung zu bekommen [57]. Der EDSS (extended disability status scale) ist ein Score, welcher 1983 entwickelt wurde [58] und bei dem die neurologische Beeinträchtigung des Patienten mit MS gemessen wird. Die Werte reichen von 0,0 (keine Beeinträchtigung) bis 10,0 (Tod durch MS). Berücksichtigt wird die generelle Beeinträchtigung des Patienten und die Beeinträchtigung von 8 verschiedenen funktionellen Systemen [59], wobei dieser Score stark von motorischer Beeinträchtigung geprägt wird und ab einem EDSS von >4 die Gehstrecke allein über den Punktwert entscheidet.

Die Prognose von Patienten mit einer RRMS oder die der Patienten mit Übergang in eine SPMS ist besser als die jener Patienten mit einer PPMS [60]. Im deutschen Register der Deutschen Multiple Sklerose Gesellschaft (DMSG) wurden über mehrere Jahre Datensätze

von über 3000 deutschen MS Patienten gesammelt und ausgewertet. Nach ca. 13 Jahren (12,7 +/- 9,2) sind nur noch 51% der Patienten ohne eine Hilfe gehfähig, 28% für eine Gehstrecke von 100 Meter auf eine Gehhilfe angewiesen und 6% der Patienten permanent auf einen Rollstuhl angewiesen [32, 61]. Diese Ergebnisse des MS Registers sind unabhängig von der durchgeführten Therapie, wobei die neueren Therapien bisher sicherlich unterrepräsentiert sind. Ein früher Krankheitsbeginn, das weibliche Geschlecht, eine schnelle Remission nach dem ersten Schub und wenige Schübe in den ersten Jahren scheinen einen positiven Effekt auf den Verlauf zu haben [32, 60]. Obwohl das Überleben der Patienten im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung weiterhin um 7-14 Jahre [32, 62] reduziert ist und 47-75% der Patienten direkt an der MS versterben [32, 62], hat sich die Gesamtprognose und die Lebensqualität der Patienten insgesamt verbessert [63, 64].

1.2. Polyomaviren

Polyomaviren sind unbehüllte DNA-Viren. Sie sind bei verschiedenen Wirbeltieren wie Säugetieren und Vögeln zu finden und befallen ebenfalls den Menschen [65]. Sie führen beim Menschen häufig zu asymptomatischen, lebenslang persistierenden Infektionen [66, 67].

Es wurden bisher 15 verschiedenen Virustypen in der Gruppe der humanen Polyomaviren identifiziert. Einen Überblick über diese Subtypen gibt es in Tabelle 1.

Table 1: Auflistung der Humanen Polyomaviren. Dargestellt sind: Name des Polyomavirus und das Jahr der Entdeckung des Virus, mit dem Virus assoziierte Symptome und Erkrankungen, Körperflüssigkeiten oder Gewebe, in denen das jeweilige Virus nachweisbar ist.

Legende: KIPyV: Karolinska Institut Stockholm, WUPyV: Washington University, MCPyV: Merkel Zell, TSPyV: Trichodysplasia Spinulosa, MXPyV: Mexiko Polyomavirus, MWPyV: Malawi Polyomavirus, STLPyV: Saint Louis Polyomavirus, NJPyV: New Jersey Polyomavirus, SPyV: Simian Polyomavirus, KM: Knochenmark

	Name / Jahr	Symptome / Erkrankung	Nachweisbar
HPyV1	BKPyV [68]/1971	BKPyV-assoziierte Nephropathie oder Uretherstenose bei Organtransplantierten [69] Hämorrhagische Zystitis bei KM-transplantierten Patienten [70]	Blut (bei symptomatischer Infektion) Urin Liquor
HPyV2	JCPyV [71]/1971	PML, Granular Cell Neuropathy (GCN) [72], JCPyV-Enzephalitis	Lymphozyten in Tonsillen Stuhl Urin Liquor und ZNS
HPyV3	KIPyV [73]/2007	Bisher nicht bekannt, asymptomatische Infektion [73]	Stuhl und Bronchiallavage
HPyV4	WUPyV [74]MM/2007	Bisher nicht bekannt, asymptomatische Infektion	Nasopharyngeal
HPyV5	MCPyV / 2009		Haut [75] zuerst im Merkel Zell CA
HPyV6	2010	Keine Symptome bekannt	Haut[75]
HPyV7	2010	Hautauschlag, Virämie bei Lungentransplantat Empfängern [76]	Haut [75]
HPyV8	TSPyV/2010	Keine Symptome bekannt [77]	Haut [77]
HPyV9	2011	Asymptomatisch im Blut von Nierentransplantierten Patienten [78]	Blut Urin
HPyV10	MXPyV oder MWPyV/2013	Gegebenenfalls assoziiert mit Durchfällen	In Papillomavirus infizierten Analkondylomata [79] Stuhlproben
HPyV11	STLPyV 2013	Keine Symptome bekannt [79]	Stuhlproben [79]
HPyV12	2013	Eventuell mit Durchfällen assoziiert [79]	Stuhlproben [79]
HPyV13	NJPyV/2013	Pankreas-transplantierten Patienten mit retinaler Erblindung und nekrotischen Plaques auf Gesicht, Hand und Kopfhaut [80]	Muskelbiopsie [80]
SV40	SPyV/1960	Bestandteil von Impfstoffen gegen Polioviren und Adenoviren, Kontakt zu Primaten [81]	Blut

1.2.1. Aufbau

Die Virionen der Polyomaviren, also die einzelnen Viruspartikel außerhalb einer Wirtszelle, bestehen aus ikosaedrischen, nicht verpackten Partikeln mit einem Durchmesser von 40-45nm. Sie besitzen eine doppelsträngige DNA mit ca. 5000 Basenpaaren [82].

Die DNA wird in eine nicht-kodierende Kontroll-Region (NCCR), welche die Expression der anderen Gene reguliert und in eine frühe und eine späte Gen-exprimierende Region unterteilt. In der Kontroll-Region werden unter anderem die Proteine Large-T und Small-T kodiert, welche in der Wirtszelle für einen Übergang in die S-Phase der Replikation sorgen. Sie werden daher auch mit einer DNA-Instabilität der Wirtszelle und dem onkogenen Potential der Polyomaviren in Verbindung gebracht [82, 83]. Die frühe genregulierende Region (early viral gene region = EVGR) kodiert für regulatorische Proteine, die in der Wirtszelle für eine suffiziente Replikation sorgen. Die späte genregulierende Region (late viral gene region = LVGR) kodiert für die drei Kapsid Proteine VP-1, VP-2 und VP-3. In dieser Region konnte bei JCPyV, BKPyV und SV-40-Virus zusätzlich eine ca. 60 Basenpaar große Region identifiziert werden, welche für das sogenannte Agnoprotein kodiert, das zusätzliche regulatorische Funktionen zu haben scheint [84, 85]. Bei anderen humanen Polyomaviren konnte ein solches Agnoprotein nicht nachgewiesen werden. Ebenfalls bei den Viren JCPyV, BKPyV und SV-40 konnte Mikro-RNA nachgewiesen werden, welche ebenfalls genregulatorische Funktionen auf Virus DNA und Wirts-DNA hat [86].

1.3. JCPy-Virus

Das JC-Polyoma Virus (JCPyV) gehört zur Familie der Polyomaviren (siehe oben). Das JCPyV wurde zum ersten Mal im Jahre 1971 isoliert. Benannt wurde es nach den Initialen des ersten Patienten, aus dessen Hirnzellen das Virus erstmals isoliert wurde [71]. Das JCPyV ist in nahezu allen Populationen endemisch. Die Infektion mit dem JCPyV erfolgt meist im Kindesalter [87]. Die Durchseuchung im Erwachsenenalter, gemessen über JCPyV-VP1 Antikörper via Luminex [88], oder über JCPyV-VP1 Antikörper via EIA (enzyme immunoassay) [89] liegt bei bis zu 50-70% [90]. Dabei beginnt der Anstieg der Seroprävalenz von JCPyV im Alter von 10 Jahren und steigt mit zunehmendem Alter [91]. Bei den meisten Patienten ist diese Infektion jedoch asymptomatisch. In vielen Fällen persistiert das Virus lebenslang, wobei der relevante Ort der Persistenz, von der eine symptomatische Reaktivierung ausgeht, nicht bekannt ist. Regelmäßig findet sich jedoch

JCPyV-DNA im Urin als Hinweis auf eine Persistenz z.B. in Nierenepithel oder den harnableitenden Wegen [92, 93].

Der genaue Infektionsweg ist bis heute noch nicht vollständig erforscht. Es wird jedoch vermutet, dass die Infektion zum einen fäkal-oral und zum anderen auch respiratorisch via Tröpfcheninfektion erfolgt. Zudem findet eine Ausscheidung über den Urin statt [94]. Die fäkal-orale Übertragung wird vermutet, da Kopien von JCPyV-DNA zum einen im Stuhl von Patienten sowie gesunden Probanden [95] und zusätzlich auch, auf Basis der Ausscheidung des Virus über den Urin, im Abwasser von diversen Großstädten nachgewiesen werden konnte [94]. JCPyV ist bei 20°C bis zu einem pH von 5 für bis zu etwa 27 Tage stabil, was eine Infektion mit diesem Virus auch über kontaminiertes Trinkwasser erklären könnte [96].

Die Infektion mit JCPyV und BKPyV erfolgt vermutlich unabhängig voneinander [97], obwohl in ca. 55% der Fälle eine gemeinsame persistierende Infektion stattfindet. Die Infektion mit JCPyV wird heutzutage meist via ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) im Serum nachgewiesen. Die Antikörper im Serum des Patienten binden hierbei an Antigene, welche am Boden des Probenreagenz (immobil) positioniert sind. Zusätzlich liegt ein Antikörper im Reagenz vor, welcher an ein Reporterenzym gekoppelt ist. Findet eine Reaktion von Antikörpern aus dem Serum des Patienten und den Antigenen statt, katalysiert das Rezeptorenzym einen Farbumschlag. Dieser Farbumschlag kann zum Teil mit bloßem Auge gesehen werden, sicher aber über ein Photometer gemessen und quantifiziert werden. Hierbei wird die optische Dichte (OD) gemessen [98]. Eine kommerzielle Form der ELISA-Variante der JCPyV-Serologie ist die sogenannte STRATIFY™ Untersuchung, welche als quantitatives Ergebnis sogenannte Indexwerte, letztlich normalisierte OD-Werte [99] des ELISAs in Referenz zu einem Kontrollwert der gleichen Messung, ausgibt [100]. Dieser Test wird unter anderem zur Risikostratifizierung verwendet, um festzustellen, ob eine Infektion mit JCPyV bereits stattgefunden hat und wie hoch die Reaktivität als möglicher Hinweis auf die Aktivität der Infektion mit JCPyV ist.

1.4. Progressive Multifokale Leukenzephalopathie

Die PML ist eine opportunistische, demyelinisierende Erkrankung vor allem der weißen Substanz des ZNS, hervorgerufen durch eine Reaktivierung einer JCPyV-Infektion im ZNS. Betroffen sind bei dieser Infektion insbesondere die Oligodendrozyten, teilweise aber auch die Astrozyten [101]. Selten können auch die Körnerzellen des Cerebellums (Granular Cell

Neuropathy , GCN) [72] und somit die Neurone direkt befallen sein [102]. Es erkrankten fast ausschließlich immunsupprimierte Patienten an der PML. So wurde die PML zuerst bei Patienten mit lympho- und myeloproliferativen Erkrankungen beschrieben. Zudem stellte sich die PML als eine häufige opportunistische Infektion bei HIV Patienten im AIDS Stadium dar [103]. Bei 5-10% der Patienten im AIDS Stadium konnte früher eine PML beobachtet werden [104]. Seit Einführung der antiretroviralen Therapie (HAART/ART = Highly active antiretroviral therapy/ antiretroviral therapy) ist die Inzidenz der PML-Infektionen bei AIDS-Patienten jedoch deutlich zurück gegangen (3,3 Fälle/1000 Personenjahre auf 1,3 Fälle/ 1000 Personenjahre bei HIV+ Patienten nach Einführung der HAART Therapie) [105]. Trotzdem sind etwa 80% der PML-Patienten HIV-Infizierte und etwa 10% hämatoonkologische Patienten [106].

Seit Einführung der selektiven immunsuppressiven Therapie der MS mit Natalizumab im Jahr 2005 wird die PML zusätzlich gehäuft bei MS-Patienten diagnostiziert (siehe oben). Efalizumab, ein Integrinblocker mit ähnlicher Wirkweise wie Natalizumab und bis 2009 für die Behandlung der Psoriasis zugelassen, wurde schließlich aufgrund des PML-Risikos vom Markt zurückgenommen. Dies veranschaulicht, dass die Integrinblockade offensichtlich das PML-Risiko systematisch steigert. Bei mindestens zwei weiteren verlaufsmodifizierenden Medikamenten der MS, nämlich Dimethylfumarat und Fingolimod liegt jedoch ebenfalls ein erhöhtes PML-Risiko vor [107]. Das Risiko wird hierbei als niedrig, aber messbar erhöht eingeschätzt. Bis September 2016 wurden 8 Fälle unter Fingolimod und vier Fälle von PML unter einer Therapie mit Dimethylfumarat gemeldet [107]. Aber auch bei Patienten unter Therapie mit weiteren immunsuppressiven Medikamenten wie Glucocorticoiden, Rituximab, Fludarabine, Infliximab etc. wird gelegentlich von PML-Fällen berichtet [108, 109]. Bei vielen dieser letztgenannten PML-Fälle lag jedoch auch eine wie oben beschriebene hämatoonkologische Erkrankung vor, die selbst für das Auftreten der PML prädisponiert, oder die PML trat in Kombination mit anderen Immunsuppressiva auf, so dass die kausale Zuordnung zwischen dem Präparat und der PML-Entwicklung weniger eindeutig gelingt.

1.4.1. Symptome

Die PML beginnt meistens schleichend subakut, das heißt im Verlauf von mehreren Tagen bis zu einer Woche entstehend, mit variablen neurologischen Defiziten. Die Art der Defizite hängt wie bei der MS von der betroffenen Region des Gehirns ab und variiert somit stark.

Die Defizite beinhalten Symptome wie Sehstörungen (19-41%), motorische Ausfälle (33-45%), Gangstörungen (13-35%), sensible Ausfälle (7-19%), Aphasien (17-40%) oder Bewusstseinsveränderungen und kognitive Beeinträchtigungen (36-54%), sowie Krampfanfälle (ca. 14%) [101]. Auch wenn die Symptome einer PML entsprechend denen einer MS ähneln können, gibt es Störungen, die eher PML-spezifisch sind als andere: so kommen z.B. retrochiasmale Sehstörungen wie eine homonyme Hemianopsie bei der PML vor, die sich sehr selten als MS-Symptom finden. Auch ein neu auftretendes Anfallsleiden bei einem Patienten mit MS unter Immuntherapie sollte an die Möglichkeit einer PML als Therapienebenwirkung denken lassen ebenso wie rasche neuropsychiatrische bzw. Verhaltensveränderungen des Patienten [110].

1.4.2. Diagnostik

Der Goldstandard in der Diagnose der PML ist auch heute noch die Hirnbiopsie, in der PML typische Läsionen identifiziert werden können. Bei der PML liegt eine histologische Triade aus Demyelinisierung, vergrößerten Zellkernen der Oligodendrozyten und bizarr geformten Astrozyten vor [111]. In der Biopsie kann JCPyV-DNA über in-Situ-Hybridisierung oder die Polymerase-Kettenreaktion (englisch: polymerase chain reaction = PCR) nachgewiesen werden [101, 112]. Wird keine Hirnbiopsie durchgeführt, hat sich ein diagnostisches Schema, bestehend aus den drei Säulen Klinik, Bildgebung (MRT) und Liquordiagnostik (JCPyV-PCR) etabliert [101]. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine PML vorliegt, ist je nach Konstellation der Befunde, adaptiert nach Berger et al., in Tabelle 1 dargestellt. Die Diagnostik der PML beginnt bei oben genannter Klinik / Symptomen meist mit einem kranialen MRT. Bei einer PML zeigen sich in der T2- und FLAIR Wichtung hyperintense Läsionen, in der T1 Wichtung sind sie hypointens, so dass diese insbesondere in der Frühphase der PML mit MS-Krankheitsaktivität verwechselt werden können. Eine Aufnahme des Kontrastmittels Gadolinium erfolgt in den Läsionen bei Natalizumab assoziierter PML häufiger (40%) als in den Läsionen bei HIV-assoziiertes PML (15%) [101], was sich mutmaßlich durch eine in Teilen verbliebene Immunkompetenz und dadurch bedingte JCPyV-gerichtete Immunantwort erklärt. Die Läsionen sind oft multifokal lokalisiert, bei Natalizumab-Patienten treten jedoch häufig auch monofokale Läsionen im Frontallappen ganz zu Beginn der Erkrankung auf [113]. Typischerweise reichen die Läsionen bis nach subkortikal und sparen dabei die sog. U-Fasern nicht aus [114]. Eine mögliche Einteilung der Läsionen ist die in unilobär (eine Hirnregion betroffen), multilobär (mehr als eine Hirnregion betroffen) und widespread (ausgedehnte Läsionen) [110].

Bei positiver Klinik und verdächtigem MRT wird der Liquor des Patienten mittels PCR auf das Vorliegen von JCPyV-DNA untersucht. Ist diese DNA im Liquor nachweisbar, gilt die Diagnose der PML gesichert.

Tabelle 2: Diagnosewahrscheinlichkeit der PML in Abhängigkeit der Untersuchungsbefunde adaptiert nach Berger et al. 2013 + = positiver Befund, - = negativer Befund

Sicherheit der PML Diagnose	Klinik	MRT	JCPyV PCR aus Liquor
Bestätigt	+	+	+
Wahrscheinlich	+	-	+
	-	+	+
Möglich	+	+	-
	-	-	+
Keine PML	-	-	-
	+	-	-
	-	+	-

Wie aus Tabelle 2 ersichtlich, kommt der JCPyV-PCR aus dem Liquor eine zentrale Bedeutung bei der PML-Diagnostik zu. Zugleich hat die JCPyV-PCR aus dem Liquor insbesondere bei Fällen von Natalizumab-assoziiertes PML eine zu geringe Sensitivität [110], je nach Studienlage von nur 60-80%. Durch negative PCR-Ergebnisse aus dem Liquor kommt es häufig zu einer Verzögerung der Diagnose der PML und somit zu einem verzögerten Therapiebeginn. Oft werden erst in der zweiten oder dritten Liquorentnahme Kopien von JCPyV-DNA nachgewiesen und dies kann sich häufig über mehrere Monate hinauszögern [110, 115].

Eine enge Kooperation zwischen der Klinik für Neurologie sowie dem Institut für Virologie am Uniklinikum Düsseldorf auf dem Gebiet der PML-Forschung hat bereits zur Entwicklung eines neuen diagnostischen Werkzeugs geführt, nämlich dem Liquor-Anti-JCPyV-Antikörper Index (ASI_{JCPyV}) [116]. Über diesen ASI_{JCPyV} soll detektiert werden, ob eine signifikante Synthese der Antikörper intrathekal, also direkt im ZNS stattfindet und nicht lediglich ein Übertreten von Antikörpern aus dem Blut nach intrathekal vorliegt. Die Bestimmung beziehungsweise Berechnung erfolgt nach der gleichen Formel, wie die MRZ-Reaktion (siehe oben). Die Formel für den ASI_{JCPyV} lautet: $ASI_{JCPyV} = (AU-CSF_{JCV}/AU-Serum_{JCV})/Q_{IgG}$ wobei gilt: $Q_{IgG} = IgG-CSF_{total}/IgG-serum_{total}$

Als AU (Arbitrary Units) sind hierbei die gemessenen Antikörperlevel entweder in Serum oder Liquor definiert, ein internationaler Standard für die Quantifizierung der Antikörper in

Internationale Einheiten (IU) existiert bisher nicht. Hier konnte nachgewiesen werden, dass bei einer Mehrheit von Patienten mit Natalizumab-assoziiierter PML bereits zum Diagnosezeitpunkt eine Antikörperbildung isoliert im zentralen Nervensystem (Nachweis eines positiven ASI_{JCPyV}) stattfindet [116], allerdings war die Sensitivität dieser Diagnostik insbesondere in der Frühphase der PML eher niedriger als die PCR [117].

1.4.3. Therapie

Da es bis heute noch keine kausale Therapie der PML gibt, ist es das Hauptziel, das Immunsystem des betroffenen Patienten zu stärken. Bei HIV-positiven Patienten sollte eine antiretrovirale Therapie begonnen oder gegebenenfalls optimiert werden. Dies führt zu einer Verbesserung des Gesamtüberlebens und auch zu einer niedrigeren Inzidenz der PML sowie Infektionen mit anderen opportunistischen Erregern [118, 119]. Bei Patienten ohne eine HIV-Infektion kann das Absetzen von immunsuppressiver Medikation das Fortschreiten der PML Symptome und Behinderungen gegebenenfalls aufhalten [120, 121], was entsprechend auch für Fälle von Natalizumab-assoziiierter PML zutrifft. Da Natalizumab jedoch eine lange biologische Wirksamkeit aufweist, hat sich eine Therapie mit Plasmapherese oder Immunadsorption etabliert [122, 123], wenngleich prospektive Studiendaten fehlen und die Wirksamkeit nicht nachgewiesen ist [110].

Zusätzlich gibt es verschiedene Medikamente, welche zur Therapie einer PML verabreicht wurden, ohne dass jedoch prospektive Evidenz für deren Wirksamkeit vorhanden wäre oder inzwischen sogar negative Studien vorliegen. Beispiele für solche Substanzen sind Cytarabin [124] und Mefloquine [125], das Antidepressivum Mirtazapin, da spekuliert wird, dass das JCPyV die Zielzellen über einen 5HT_{2a} Rezeptor infiziert [126], oder der Immun-Checkpoint-Inhibitor Pembrolizumab (PD-1 Rezeptorblockade), bei dem in einer Fallserie bei allen Patienten ein Abfall der JCPyV-Viruslast im Liquor sowie bei 5 der 8 Patienten eine klinische Verbesserung beobachtet werden konnte [127].

Im Rahmen der Therapie der PML beziehungsweise dem Absetzen von immunsuppressiver Therapie oder deren forcierter Elimination mittels PLEX/IA kommt es häufig zum sogenannten „Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome“ (IRIS), welches in ähnlicher Weise auch im Rahmen der antiretroviralen Therapie (HAART) bei HIV bekannt ist [128]. Es ist definiert als eine paradoxe Verschlechterung des klinischen Status eines Patienten trotz verbesserter Immunkompetenz, hervorgerufen durch die überschießende Reaktion des wiederhergestellten Immunsystems gegen virus-infizierte Zellen. IRIS tritt

häufig auch bei Natalizumab-assoziiertes PML kurz nach einer durchgeführten Plasmapherese [129] oder auch ohne Plasmapherese mehrere Wochen (im Schnitt ca. 3 Wochen nach Beginn der PML-Therapie [122]) nach der letzten Natalizumabgabe auf [122, 123]. Therapiert wird das IRIS mit einer Glucocorticoid Stoßtherapie [130, 131], teils wurde auch Maraviroc eingesetzt, da hier ein Abfall der CCR5+ Zellen im Liquor beobachtet werden kann [132]. Diese Therapie ist jedoch nicht evidenzbasiert, es liegen lediglich Fallberichte vor.

1.4.4. Prognose

Die PML ist eine schwere Erkrankung, die bei einem großen Teil der Patienten fatal verläuft. Die Gesamtmortalität liegt auch heute noch bei ca. 30% nach einem Jahr und 50% nach 2 Jahren [133]. Das mittlere Überleben der Patienten, gerechnet über alle zugrunde liegenden Ätiologien, liegt auch heute noch bei wenigen Monaten bis zu einem Jahr. Es gibt jedoch Unterschiede in Prognose und Mortalität, bezogen auf die zugrunde liegende Ursache der PML. HIV-Patienten, die eine PML entwickelt haben, weisen eine schlechtere Prognose auf. Seit Einführung der HAART Therapie hat sich deren Prognose jedoch leicht gebessert (mittleres Überleben von 0,4 Jahren auf 1,8 Jahre, bessere 1-Jahres Überlebensrate bei Beginn einer HAART Therapie) [134, 135]. Die Patienten, die die PML überleben, behalten jedoch häufig Residuen der oben beschriebenen Symptome zurück [134, 136].

Bei den Patienten, die eine PML unter Natalizumab Therapie entwickelt haben, liegt die Überlebensrate mit ca. 80% (laut Herstellerfirma) deutlich höher. Die Patienten zeigen jedoch zu großen Teilen auch nach längerer Zeit noch mittelschwere (47%) bis schwere (40%) Residuen, [137] der Erkrankung gemessen anhand des Karnofsky-Index, wohingegen nur 13% milde Residuen zeigen. Dieser Index wurde 1949 ursprünglich zur Evaluation der Lebensqualität von Krebspatienten entwickelt, wird heute jedoch umfassend bei diversen Krankheitsbildern verwendet und weist eine Spanne von 100 % (keine Einschränkungen im Alltag) bis 0% (Tod durch Erkrankung) auf. Der Karnofsky Index fällt bei PML auf Werte unter 80%. Zusätzlich kommt es nach PML zu einem Anstieg des EDSS (Erklärung s.o.) von median 2,5 vor PML-Beginn auf 5,5 ca. 1,5 Jahre nach PML [138]. Das Outcome von Natalizumab-Patienten, bei denen die PML Diagnose gestellt wird, wenn sie noch keine klinische Symptomatik aufweisen, ist im Vergleich zu den symptomatischen Patienten signifikant besser. Das Überleben nach 12 Monaten war bei den asymptomatischen Patienten mit 96,4% höher als bei den symptomatischen Patienten mit 75,4%. Zusätzlich war auch das

neurologische Outcome bei den asymptomatischen Patienten besser. Hier ist der EDSS sowohl bei Diagnose (4,1 vs. 5,4), als auch 6 Monate nach Diagnose (4,9 vs. 6,6) niedriger als bei den symptomatischen Patienten [139].

1.4.5. Meldung von Natalizumab-assoziierten Fällen von PML an das Paul-Ehrlich-Institut

Das Paul-Ehrlich-Institut (PEI) ist das Bundesinstitut für Impfstoffe und biomedizinische Arzneimittel und Teil des Bundesministeriums für Gesundheit. Es prüft und bewertet zugelassene Impfstoffe und biomedizinische Arzneimittel, zu denen auch die monoklonalen Antikörper gehören. Allgemein besteht bei Natalizumab ein Spontanmeldesystem von Nebenwirkungen, da es nicht gesetzlich vorgeschrieben ist, Komplikationen zu melden, wie zum Beispiel bei Impfkomplicationen. Allerdings haben Angehörige von Heilberufen eine berufsrechtliche Verpflichtung, Nebenwirkungen zu melden. In der Fachinformation für Natalizumab wird darauf hingewiesen, dass jeder Arzt oder anderer Angehöriger eines Gesundheitsberufes aufgefordert wird, den Verdachtsfall jeglicher Nebenwirkungen einer Natalizumab-Therapie umgehend an das PEI zu melden. Dabei sind sowohl leichte Nebenwirkungen wie auch der Verdacht auf eine PML gemeint. Im Rahmen des Informationsfreiheitsgesetzes von 2006 ist es wiederum jedem Bürger möglich, Informationen von amtlichen Behörden anzufordern, da diese verpflichtet sind, Auskunft zu erteilen, einschließlich Informationen zu Fällen von Natalizumab-assoziiierter PML. Diese Daten wurden kürzlich für Fälle von Natalizumab-assoziiierter PML abgerufen und publiziert [110].

1.5. Natalizumab

Natalizumab ist ein Medikament, das in den 1990 Jahren entwickelt wurde und unter dem Namen Tysabri® von der Firma Biogen vermarktet wird. Das Medikament ist ein rekombinanter monoklonaler Antikörper, der zuerst aus einer Myelom-Zelllinie von Mäusen hergestellt und anschließend humanisiert wurde. Dies bedeutet, dass lediglich die Antigenbindungsstelle eine aus der Maus stammende Proteindomäne ist. Die restlichen Anteile des Antikörpers bestehen aus menschlichen Proteindomänen [140]. Der monoklonale Antikörper richtet sich gegen die Integrinuntereinheit alpha-4, welche sich auf der Oberfläche von Leukozyten im Blut befindet und für den ersten Schritt der Adhäsion an entzündetes Gefäßendothel verantwortlich ist. Durch die Blockade dieser Adhäsion ist es

den Leukozyten (Lymphozyten und Monozyten) kaum noch möglich, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und für eine Entzündung in den betroffenen Bereichen zu sorgen [141]. Die Zulassung für Natalizumab zur Therapie der Multiplen Sklerose wurde von der Food and Drug Administration (FDA) in den USA erstmals im November 2004 erteilt. Auf Grund von drei Fällen von PML wurde die Zulassung im Februar 2005 freiwillig von der Herstellerfirma Biogen zurückgezogen [142]. Im Juni 2006 erfolgte jedoch eine Wiedenzulassung in den USA und auch die erstmalige Zulassung in Europa, nachdem detaillierte Risiko-Nutzenanalysen vorlagen. In Kanada erfolgte die erstmalige Zulassung im April 2008. Natalizumab wird als Monotherapie bei erwachsenen Patienten zur Schubprophylaxe bei hochaktiver RRMS angewendet [33].

In einer der Zulassungsstudien, der Phase-III-AFFIRM Studie, zeigte sich, dass Natalizumab die klinische Schubrate der MS nach einem Jahr relativ zur Placebogruppe um 68% senkt. Zusätzlich wurde im Vergleich zur Placebo-Gruppe, eine geringe Zahl von neuen oder sich vergrößernden T2 hyperintensiven Läsionen im MRT (relative Reduktion von 83% nach zwei Jahren) beobachtet. Außerdem lag das Risiko der andauernden bestätigten kumulativen Behinderungsprogression nach 2 Jahren, gemessen auf der EDSS-Skala nach 2 Jahren um 42% geringer als in der Placebogruppe (Risiko der Progression in der Natalizumab Gruppe bei 17% gegen 29% in der Placebogruppe und somit eine relative Risikoreduktion von 42%) [143]. Damit gilt das Medikament allgemein als ein Medikament mit hoher Wirksamkeit auf die MS-Krankheitsaktivität. Das Medikament wird alle vier Wochen als Infusion verabreicht. Die Dosis einer einmaligen Gabe beträgt 300 mg [144].

Auch nach der Wiedenzulassung im Jahr 2006 wurden weiterhin Fälle von PML im Zusammenhang mit einer Natalizumab Therapie beobachtet. Bis März 2019 wurden von der Herstellerfirma 814 Natalizumab-assoziierte PML Fälle berichtet. (USA Tysabri PML Update). <https://medinfo.biogen.com> (abgerufen am 08. März 2019))

Verschiedene Maßnahmen wurden von den Zulassungsbehörden inzwischen ergriffen, um das PML-Risiko zu senken. Zugelassen wurde Natalizumab nur noch für rasch fortschreitende Fälle von hochaktiver RRMS und solche, die trotz vollständiger Behandlung mit mindestens einer krankheitsmodifizierenden Therapie weiterhin eine hochaktive RRMS aufweisen [144]. Zudem wurde ein Modell zur Risikostratifizierung erarbeitet, bei dem die Behandlungsdauer, eine Vorbehandlung mit bestimmten Immunsuppressiva und insbesondere die qualitativen (Serostatus) und quantitativen Werte einer anti-JCPyV-Antikörpertestung einfließen. Die Antikörper im Serum gegen JCPyV werden über die

STRATIFY™ Untersuchung nachgewiesen. Das Prinzip dieser Untersuchung wurde bereits oben im Kapitel JCPyV beschrieben.

Für Patienten ohne vorherige Immunsuppression und negativer JCPyV Serologie wird das Risiko, eine PML zu entwickeln, mit etwa 1:10.000 als gering eingeschätzt. Sind die Patienten ohne vorherige Immunsuppression jedoch seropositiv auf JCPyV, steigt das PML Risiko mit der Behandlungsdauer und der Höhe der anti-JCPyV-Antikörperwerte (sog. Indexwerte, siehe Abb. 1). Besonders hoch ist das Risiko einer PML bei Patienten mit Indexwerten >1.5 und langer Behandlungsdauer sowie bei Patienten, die bereits eine Behandlung mit klassischen Immunsuppressiva (Mitoxantron, Cyclophosphamid, Azathioprin, Methotrexat, Calcineurininhibitoren wie Tacrolimus, Pimecrolimus und Ciclosporin A) erhalten haben und Antikörper gegen JCPyV aufweisen, hier unabhängig von den Indexwerten. Bei Vorliegen einer bestimmten Risikokonstellation kann das Risiko somit bei größer als einem von hundert behandelten Patienten liegen und damit zu einem häufigen, und aufgrund der Schwere der Komplikation, kaum zu vertretenden Risiko werden [145].

Das Risiko, eine PML zu entwickeln, wird also durch verschiedenen Faktoren erhöht:

1. *Serologisch nachweisbare Antikörper gegen JCPyV (Anti-JCPyV-AK):* Liegt bei Patienten ein positiver JCPyV-AK vor, korreliert das Risiko der Entwicklung einer PML mit der Höhe des Antikörper-Index: bei einem Indexwert von $\leq 0,9$ scheint das PML Risiko niedrig zu sein; bei Patienten mit Werten über 1,5 und einer Behandlungsdauer mit Natalizumab von mehr als 2 Jahren steigt das Risikoerheblich an, bei Anti-JCPyV-AK negativen Patienten liegt das geschätzte Risiko bei 0,1/1000 eine PML unter Natalizumab zu entwickeln [146]
2. *Therapiedauer von Natalizumab von mehr als zwei Jahre:* Bei Patienten mit einem niedrigeren JCPyV-Index von 0,9-1,5 ohne vorherige Behandlung mit klassischen Immunsuppressiva ist ein Risiko von 1:1000 nach 3 Jahren Therapie erreicht
3. *Stattgehabte Vorbehandlung mit immunsupprimierenden Medikamenten vor Beginn der Therapie mit Natalizumab* [144]. Hier sind die Werte des JCPyV-AK-Index nicht verwertbar

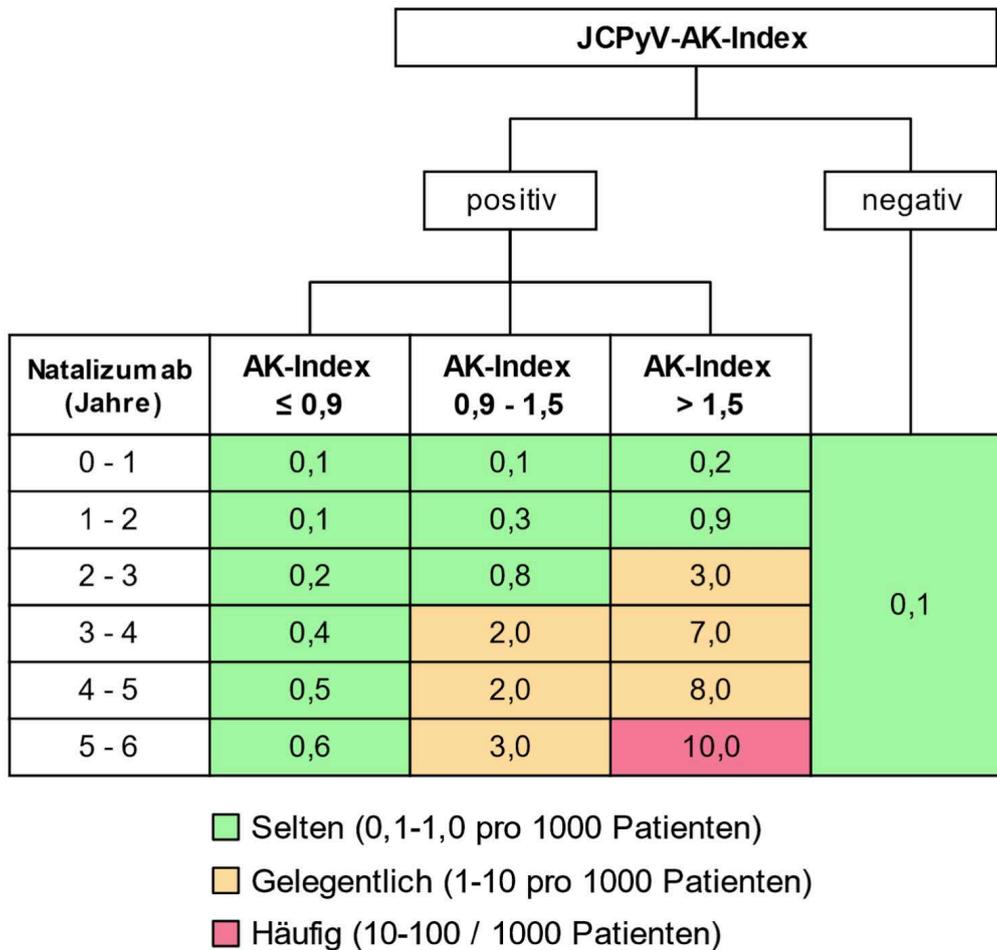


Abbildung 1: Risikostratifizierung des PML Risikos in Abhängigkeit von Anti-JCPyV-Antikörper Status, Therapiedauer mit Natalizumab (in Jahren) und Antikörperindex. Modifiziert nach Abbildung aus Natalizumab-Informationen für Patienten (März 2019, Seite20) [147]. Dargestellt ist das jeweilige Risiko der Entwicklung einer PML pro 1000 mit Natalizumab behandelte Patienten. AK-Index = Anti-JCPyV-Antikörper Index. Gültig nur für Patienten ohne vorherige Behandlung mit klassischen Immunsuppressiva.

Diskutiert wird zusätzlich der Mehrwert des Nachweises von Antikörpern gegen JCPyV im Liquor basierend auf der Hypothese, dass die PML bei Natalizumab Patienten nicht durch ein Vorliegen des Virus im Blut getriggert wird, sondern durch eine Reaktivierung des latent vorliegenden JCPyV oder Fragmenten des Virus im ZNS der Patienten [148]. Diese Reaktivierung könnte ablaufen, da Natalizumab die Migration von Immunzellen in das ZNS verhindert, wohingegen sie im Blut weiter zirkulieren können, was sich in einem herabgesetzten CD4+/CD8+ Verhältnis im Liquor [149] verglichen mit peripherem Blut darstellt [141]. Somit liegt keine allgemeine Immunsuppression vor, sondern eine lediglich auf das ZNS beschränkte Immunsuppression [150]. Diese Überlegung wird unterstützt durch die Beobachtung, dass bei einigen Natalizumab Patienten eine positive JCPyV-PCR aus dem Liquor im Serum vorliegt, obwohl sie keine klinische PML entwickeln [151]. Gleichzeitig

gibt es Berichte, dass bei einigen Patienten mit diagnostizierter PML keine JCPyV DNA im Serum oder Urin nachgewiesen werden kann [152].

1.6. Blutgruppensystem nach AB0

Entdeckt wurde das AB0-Blutgruppensystem von Landsteiner 1900 [153].

Es besteht aus zwei verschiedenen Antigenen, nämlich A und B. Diese Antigene sind definiert durch immundominante Kohlenhydrate. Beim A-Antigen ist das unterscheidende Kohlenhydrat N-Acetylgalactosamin und beim B-Antigen ist es Galactose [153]. Diese Kohlenhydrate werden von den Glycosyltransferasen auf die Kohlenhydratketten der Erythrozyten angebaut, welche man das H-Antigen nennt. Die Allele auf dem Chromosom kodieren letztendlich für die Glycosyltransferasen. Bei Blutgruppe 0 kodiert das Gen für ein Enzym, welches nicht in der Lage ist, weitere Kohlenhydrate an das H-Antigen anzubauen. Zusätzlich ist das AB0 Blutgruppensystem über AB0-Antikörper definiert, welche sich als Anti-A und Anti-B Isohämagglutinine vom IgM-Typ gegen die A- und B-Antigene der Erythrozyten richten.

Dadurch setzen sich folgende vier Blutgruppen, wie in Tabelle 3 dargestellt, zusammen:

Tabelle 3: Verteilung von Blutgruppenantigenen und Blutgruppenantikörpern nach Blutgruppe

Blutgruppe	Blutgruppenantigene auf den Erythrozyten	Blutgruppenantikörper im Serum
A	A	Anti-B
B	B	Anti-A
AB	A und B	Keine
0	keine	Anti-A und Anti-B

Die AB0 Blutgruppen sind das wichtigste Kriterium bei Bluttransfusionen, da es bei blutgruppeninkompatibler Transfusion zu schwerwiegenden sogenannten akuten hämolytischen Transfusionsreaktionen kommen kann, weshalb immer AB0-Blutgruppenkompatibel transfundiert werden muss. Blutgruppe 0 fungiert als Universalspender für Erythrozytenkonzentrate [154].

Die Vererbung der AB0-Blutgruppen findet über einen ko-dominanten Erbgang statt. Das relevante Gen liegt auf dem Chromosom 9q34.2 [155]. Dies bedeutet, dass das Gen für Blutgruppe A und das Gen für Blutgruppe B gleichwertig dominant sind. Das Gen für Blutgruppe 0 hingegen ist rezessiv gegenüber den Genen für A und B.

Die Blutgruppe 0 könnte ein weiterer Risikofaktor für die Entwicklung einer PML sein. Dies könnte damit zusammenhängen, dass JCPyV die Eigenschaft hat, Erythrozyten der Blutgruppe 0 zur Hämagglutination zu bringen. Diese Eigenschaft wurde in der Vergangenheit auch in der Antikörperdiagnostik genutzt, unter anderem bei dem Hämagglutinations-Hemmtest [156], einer ersten serologischen Methodik, bevor spezifischere ELISA-Methoden verfügbar wurden (siehe oben). Auf dieser Basis wurde die Hypothese formuliert, dass an B-Lymphozyten gebundenes JCPyV eine Aggregation von Lymphozyten und Erythrozyten im kortikalen Kapillargebiet, in dem niedrige Flussgeschwindigkeiten herrschen, verursachen könnte [157]. Dies könnte dann den Übertritt von JCPyV-DNA über die Blut-Hirnschranke begünstigen und somit ein Risikofaktor für die Entwicklung einer PML darstellen. Eine Pilotstudie aus den USA zeigte, dass Patienten mit Blutgruppe 0 möglicherweise ein höheres Risiko für die Entwicklung einer PML haben könnten. Allerdings waren die Fallzahlen zu gering, so dass keine statistische Signifikanz erreicht werden konnte [157]

Im Rahmen von genetischen Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen verschiedenen Wirts-Genen und der Seropositivität gegen JCPyV zeigte sich neben einem deutlichen Zusammenhang zwischen Genen der HLA-Region und den Antikörper-Werten [158], außerhalb der HLA-Region interessanterweise ein Zusammenhang zwischen der Anti-JCPyV-VP1 Seroantwort und zwei unabhängigen Genen, von denen eines das auf Chromosom 9 lokalisierte AB0-Blutgruppengen ist. Patienten mit dem Gen für Blutgruppe 0 zeigten hier ein höheres Risiko für einen positiven Anti-JCPyV-Antikörperstatus [159].

2. Fragestellung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Kernfragen bearbeitet.

Ziel des ersten, experimentellen Teils dieser Arbeit war es, die oben beschriebene mögliche Assoziation zwischen dem ABO-Blutgruppensystem und dem PML-Risiko zu bestätigen oder zu widerlegen. Dabei wurde die Verteilung der Blutgruppen des ABO-System bei PML-Patienten und Kontrollen und zusätzlich das ABO-System hinsichtlich seiner Einflüsse auf die Höhe der Anti-JCPyV-Serumantworten untersucht.

Im zweiten, statistischen Teil der Arbeit wurden verfügbare klinische Daten aus Fallberichten des Paul-Ehrlich-Institut (PEI) über alle in Deutschland aufgetretene Fälle bis April 2016 von Natalizumab-assoziiertes PML mit Serum- und Liquor-Antikörperantworten sowie den ASI_{JCPyV} -Werten, verfügbar am Institut für Virologie in Düsseldorf, zusammengeführt. Ziel war es dabei zu ermitteln, ob diese serologischen Werte zusätzlichen diagnostischen Wert bei Verdachtsfällen von PML erbringen, insbesondere bei zu Beginn der Erkrankung negativer Liquor-PCR oder sehr geringen Kopienzahlen von JCPyV-DNA aus dem Liquor.

3. Material und Methoden

3.1. Patientenproben und Patientendaten

Analysiert wurden anonymisierte Daten, die vom Institut für Virologie der Universität Düsseldorf bereitgestellt wurden. Diese Daten wurden im Rahmen von Routineuntersuchungen der Diagnostik der PML aus Liquor- und Serumproben erhoben.

Die Verwendung dieser Daten zur retrospektiven Auswertung wurde von der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität positiv bewertet. (Studiennummer: 5724R, 04.11.2016)

Aus gelagerten Serumproben eines Teils dieser Patienten konnte eine Blutgruppenbestimmung durchgeführt werden. Auch für diese Vorhaben liegt ein separates Votum der Ethikkommission vor (Studiennummer: 5683R, 28.09.2016)

3.2. Patientencharakteristika

3.2.1. Patientenkollektiv, in dem die Blutgruppenbestimmung erfolgte

Für den ersten, experimentellen Teil der Arbeit wurden am Institut für Virologie der Universität Düsseldorf aus der Routinediagnostik verfügbare Serumproben verwendet und eine Blutgruppenbestimmung ergänzt. Die anonymisierten Serum-Proben erstrecken sich über den Zeitraum von Januar 2008 bis August 2016 bei Fällen von PML und bei MS-Fällen, die mit positiver MRZ-Reaktion getestet wurden. Aufgrund der hohen Spezifität der JCPyV-PCR-Untersuchung [160] aus dem Liquor für die Diagnose der PML wurden Patienten mit positiver JCPyV-PCR aus dem Liquor als PML-Gruppe definiert. Die PML-Gruppe umfasst Patienten, die eine PML unter Therapie der MS mit Natalizumab entwickelten, im Folgenden als Natalizumab-PML bezeichnet, PML-Patienten mit positiver HIV-Serologie, im Folgenden als HIV-PML bezeichnet, und PML-Patienten mit onkologischer Erkrankungen (Erkrankungen des blutbildenden Systems (Leukämien und Lymphome)), im Folgenden als onkologische PML bezeichnet. Bei einem Teil der PML ließ sich die zugrundeliegende Ursache nicht zweifelsfrei zuordnen. Nach Alter und Geschlecht gematchte, anonymisierte Daten zu Seren von Patienten mit positiver MRZ-Reaktion dienten als Kontrollgruppe. Da die MRZ-Reaktion eine hohe Spezifität für die MS aufweist (siehe oben), wurde diese Gruppe als MS-Kontrollgruppe definiert.

3.2.2. Patientenkollektiv (PEI-Kollektiv), welches mit Daten der serologischen Antikörper Diagnostik zusammengeführt wurde

Für den zweiten, statistischen Teil der Arbeit wurden anonymisierte Daten des Paul-Ehrlich-Instituts (PEI), verfügbar über die Anfrage an das PEI nach Informationsfreiheitsgesetz [110], sowie Daten von Routineuntersuchungen der Diagnostik der PML aus Liquor- und Serumproben, verfügbar am Institut für Virologie der Universität Düsseldorf, miteinander abgeglichen und ausgewertet.

Da das Institut für Virologie der Universität Düsseldorf zum einen eigene Patienten aus der hiesigen Neurologie des Uniklinikums Düsseldorf zur Diagnostik untersucht und zum anderen als Konsiliarlabor auch externer Zuweiser genutzt wird, war davon auszugehen, dass für einen relevanten Anteil der Patienten, welche an das PEI gemeldet wurden, ergänzende Daten zu JCPyV- und BKPyV-Antikörperantworten sowie zu PCR Ergebnissen verfügbar waren.

Da die Natalizumab-assoziierte PML mit 142 Fällen in Deutschland [110] insgesamt eine seltene Erkrankung ist, war davon auszugehen, dass die beiden anonymisierten Datensätze über vorab definierte Kriterien in vielen Fällen abgeglichen werden konnten. Als Kriterien der Verknüpfung wurden die folgenden Parameter, welche in der Regel bei jedem Patienten vorliegen, vorab definiert:

1. Das Abnahmedatum der Liquor- und Serumprobe
2. Das quantitative Ergebnis der JCPyV-PCR Untersuchung aus Liquor und Serum des Patienten. Dieses Ergebnis wird in Kopien pro Milliliter (c/ml) angegeben
3. Das Alter zum Diagnosezeitpunkt
4. Das Geschlecht

Die Zuordnung der zwei anonymisierten Datensätze gelang dabei in der Regel zunächst über den Abgleich von Datum und Kopienzahl im Liquor, vielfach bestätigt über die Kopienzahl im Serum. Das Abnahmedatum war meist in den Berichten des PEI dokumentiert. Korrespondierend dazu lag am Institut für Virologie das Eingangsdatum einer Probe vor.

Um die Auswertung zu erleichtern, wurden die PML-Fälle anhand der Liquor-PCR-Daten kategorisiert. Von besonderem Interesse waren die Fälle, bei denen trotz PML-Verdacht aufgrund von Klinik und/oder MRT-Bildgebung, die Liquor-PCR zunächst negativ ausfiel

oder eine niedrige Kopienzahl aufwies. Der Grenzwert (sogenannter Cut-off) für eine niedrige Kopienzahl wurde basierend auf publizierten Daten bei 100 c/ml gesetzt [110, 116].

3.3. Methodik der Blutgruppenbestimmung

3.3.1. Material

- NaCl, Enzyme Test and Cold Agglutinins ID- Card (Firma: Bio-Rad, Produkt Identifikation: 50520)
- Testerythrozyten für die Serumgegenprobe, ID-DiaCell ABO (Firma: Bio-Rad)
 - o Blutgruppe A
 - o Blutgruppe B
 - o Blutgruppe 0
- Patientenserum oder Patientenplasma (je nach eingesendetem Material)
- ID-Zentrifuge 24S (Firma Bio-Rad)

3.3.2. Prinzip der ABO-Bestimmung

Da die gelagerten Proben der Patientendieser Studie fast ausschließlich Serum umfassten, wurde in diesem Teil eine modifizierte Blutgruppenbestimmung, nämlich die Serumgegenprobe verwendet. Bei der Serumgegenprobe werden standardisierte Testerythrozyten der Blutgruppen A, B und 0 verwendet, die mit dem zu bestimmenden Serum vermischt werden. Reagiert das Serum des Patienten mit den Testerythrozyten, agglutinieren diese und bilden so größere Komplexe. Bei der anschließenden Zentrifugation sind diese Komplexe größer als einzelne Erythrozyten und können daher nicht mehr durch die Gelschicht der Mikroröhrchen nach unten wandern. Somit bilden sie eine rote Linie im oberen Bereich des Mikroröhrchens. Reagieren die Antikörper des Serums nicht mit den Testerythrozyten, können die Erythrozyten während der Zentrifugation leicht durch die Gelschicht des Mikroröhrchens wandern und befinden sich nach Zentrifugation am Boden des Mikroröhrchens.

Ein positives Ergebnis liegt also vor, wenn die Erythrozyten mit den Antikörpern im Serum agglutiniert sind und eine rote Linie auf dem Gel der ID Karte bilden oder im Gel verteilt sind. Ein negatives Ergebnis liegt vor, wenn die Erythrozyten nicht mit den Antikörpern des Serums reagiert haben und somit bis auf den Boden des Mikroröhrchens abgesunken sind und dort ein Sediment bilden.

Aus den drei parallel ablaufenden Reaktionen mit den Testerythrozyten A, B und 0 kann man auf diese Weise die Blutgruppe des Patienten ablesen (Siehe Tabelle 4). Patienten mit Blutgruppe A haben in ihrem Serum Antikörper gegen Erythrozyten der Blutgruppe B. Ihr Serum reagiert daher positiv mit den Testerythrozyten B, nicht aber mit Erythrozyten der Blutgruppe 0, diese keine Blutgruppenantigene tragen. Patienten mit Blutgruppe B haben analog dazu in ihrem Serum Antikörper gegen Blutgruppe A, weshalb ihr Serum mit den Testerythrozyten A reagieren würde. Patienten mit der Blutgruppe AB tragen zwar auf ihren Erythrozyten beide Blutgruppenantigene, haben in ihrem Serum jedoch keine Blutgruppenantikörper. Daher reagieren sie mit keinem der Testerythrozyten. Patienten mit Blutgruppe 0 haben selbst keine Blutgruppenantigene auf ihren Erythrozyten, jedoch in ihrem Serum sowohl Antikörper gegen Blutgruppe A als auch Antikörper gegen Blutgruppe B, weshalb sie mit beiden Testerythrozyten reagieren. Da Erythrozyten der Blutgruppe 0 keine Blutgruppenantigene tragen, sollten die Testerythrozyten in der Untersuchung mit keinem Serum reagieren. Sie dienen somit als Negativkontrolle. Sollte also bei 0 eine Reaktion vorliegen, liegt eine Kontamination vor, oder es wurde nicht sorgfältig gearbeitet

Tabelle 4: Bestimmung der Blutgruppe durch Ablesen der Reaktionen:

Blutgruppe	Testerythrozyten		
	A	B	0
A	Negativ	Positiv	Negativ
B	Positiv	Negativ	Negativ
AB	Negativ	Negativ	Negativ
0	Positiv	Positiv	Negativ

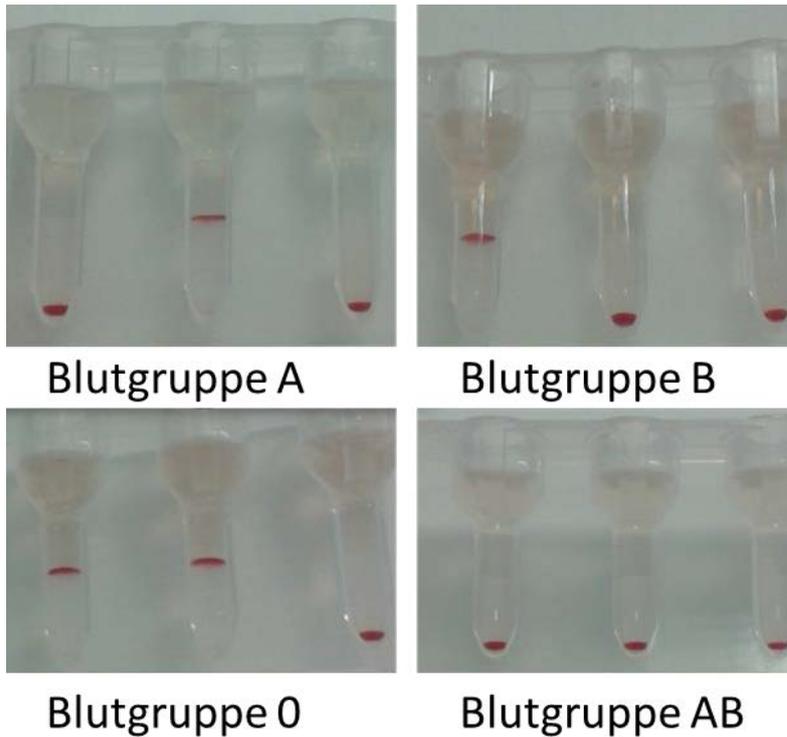


Abbildung 2: ID Karten zur Serumgegenprobe mit den Testerythrozyten A1, B und 0 mit Ergebnissen der verschiedenen Blutgruppen. In jeder Einzelabbildung sind im linken Reagenz Erythrozyten der Blutgruppe A, im mittleren Reagenz Erythrozyten der Blutgruppe B und im rechten Reagenz Erythrozyten der Blutgruppe 0. Oben links: Blutgruppe A, Oben rechts: Blutgruppe B, Unten links: Blutgruppe 0. Unten rechts: Blutgruppe AB.

3.3.3. Durchführung der ABO-Bestimmung

Die Probenfläschchen mit den Testerythrozyten müssen vor Gebrauch vorsichtig geschwenkt werden, um eine gleichmäßige Verteilung in der Suspension zu gewährleisten, da sich die Erythrozyten bei Nichtgebrauch am Boden absetzen. Die Cold-Agglutinin-ID-Karten werden mit der Probennummer des Patienten beschriftet und die Schutzhülle wird abgezogen. Da pro ID Karte sechs Mikroröhrchen vorhanden sind und pro Testung drei benötigt werden, können pro ID Karte zwei Patientenserum getestet werden. An der entsprechenden Stelle sollte vermerkt werden, in welches Mikroröhrchen welche Testerythrozyten pipettiert werden.

Nach der Vorbereitung werden nun jeweils 50 µl der Testerythrozyten A, B und 0 in ihr jeweiliges Mikroröhrchen pipettiert. Anschließend werden 50 µl des Patientenserums oder Patientenplasma in jedes Mikroröhrchen pipettiert. Wichtig ist es hierbei, eine Kontamination der Pipette mit der Testerythrozyten Suspension zu vermeiden.

Im Anschluss erfolgt eine Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur, um den Proben Zeit zur Reaktion zu geben, bevor die ID Karten für weitere 10 Minuten in einer

speziellen ID Zentrifuge zentrifugiert werden. Nach Ablauf der Zeit in der Zentrifuge kann das Ergebnis direkt abgelesen werden.

3.4. Statistik

Für die statistischen Tests wurden IBM SPSS Statistics 23 für Windows und GraphPad Prism Version 6.00h für MAC La Jolla California USA verwendet. Da die Daten nicht normalverteilt waren, wurden nicht parametrische Tests wie der Mann-Whitney-U Test und der Chi Quadrat Test verwendet, um die Daten zu vergleichen.

Für die Abbildungen wurde ebenfalls GraphPad Prism und IBM SPSS Statistics, sowie Microsoft Office und Microsoft Excel verwendet.

4. Ergebnisse

4.1. Das AB0-System und die Assoziation mit dem PML-Risiko

4.1.1. Basischarakteristika der Patienten, bei denen eine Bestimmung der Blutgruppe erfolgte

Die folgende Tabelle 5 zeigt die Basischarakteristika der beiden Gruppen, bei denen die Blutgruppen getestet wurden. Die beiden Gruppen, die PML- und die MS-Kontrollgruppe unterschieden sich nicht im Alter, jedoch in der Geschlechterverteilung. Die Gruppe der Natalizumab-assoziierten Fälle der PML war die größte der PML-Subgruppen.

*Tabelle 5: Zusammensetzung der Patientenkollektive, bei denen eine Blutgruppentestung erfolgte. *bei einem Teil der Patienten lag die Information über die Ursache der zugrundeliegenden Immunsuppression nicht vor*

	PML-Gruppe	MS-Kontrollgruppe
N	62	64
Alter	50.5 (SD 13.4)	45.7 (SD 15.2)
Geschlecht	45.2% weiblich	75.0% weiblich
Zugrunde liegende Immunsuppression		
Natalizumab	27 (43.5%)	
HIV	7 (11.3%)	
Onkologisch	5 (8.1%)	
Unbekannt*	23 (37.1%)	

4.1.2. Blutgruppenverteilung in der PML- und Kontrollgruppe

Die durchgeführte Blutgruppenbestimmung durch die Serumgegenprobe erfolgte bei 62 Patienten mit PML und 64 MS-Kontrollpatienten mit positiver MRZ- Reaktion. Die Verteilung der Blutgruppen in beiden Gruppen ist in Abbildung 3 dargestellt. Blutgruppe 0 war in diesem Vergleich in der PML-Patientengruppe im Vergleich zur MS-Kontrollgruppe überrepräsentiert (46,8% in der PML-Gruppe gegenüber 35,9% in der MS-Kontrollgruppe) Allerdings überlappten die 95% Konfidenzintervalle der beiden Gruppen, sodass der Unterschied statistisch nicht signifikant war. Im Vergleich der beiden Gruppen, aufgeteilt nach allen vier Blutgruppen, ergab der Chi Quadrat Test keinen signifikanten Unterschied der beiden Gruppen ($p = 0,369$). Vergleicht man die beiden Gruppen so, dass man die jeweilige Häufigkeit von Blutgruppe 0 der Häufigkeit aller anderen drei Blutgruppen gegenüberstellt (also 0 gegen A, B und AB), war der Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen im Chi Quadrat Test ($p = 0,217$) nicht signifikant.

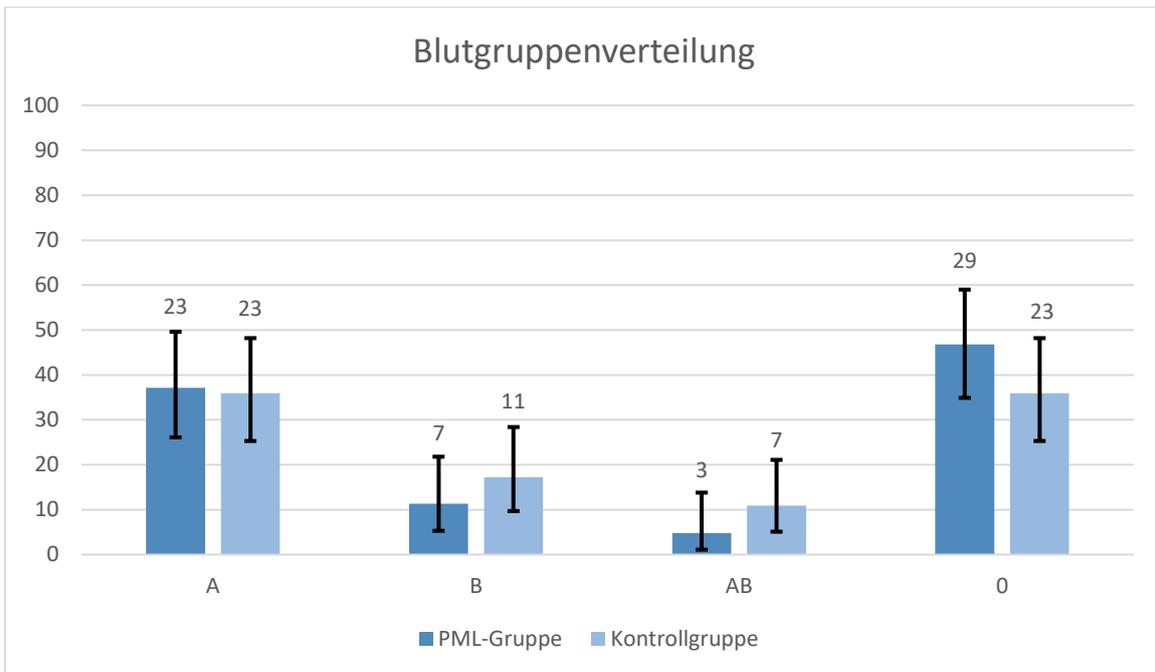


Abbildung 3: Blutgruppenverteilung der PML-Gruppe und der MS-Kontrollgruppe. Die Säulen zeigen den prozentualen Anteil mit 95% Konfidenzintervall der Prozente. Die Zahlen zeigen den Anteil der jeweiligen Blutgruppe in absoluten Zahlen.

4.1.3. Blutgruppenverteilung in der Natalizumab-PML-Subgruppe im Vergleich zur MS-Kontrollgruppe

In der Natalizumab-Subgruppe fiel auf, dass die Blutgruppe 0 im Vergleich zur Gesamtgruppe aller PML-Patienten mit 59,3% deutlicher überrepräsentiert war. Blutgruppe A hingegen war im Vergleich zu den anderen Gruppen in dieser Subgruppe leicht unterrepräsentiert. Allerdings überlappte auch hier das 95%-Konfidenzintervall der Natalizumab-Subgruppe mit dem 95% Konfidenzintervall der MS-Kontrollgruppe. Jedoch lag der relative Anteil von Natalizumab-Patienten mit Blutgruppe 0 bei 59,3% nicht im 95% Konfidenzintervall der MS-Kontrollgruppe (25,3% - 48,2%). Im Vergleich der Häufigkeiten der Natalizumab-Subgruppe mit der MS-Kontrollgruppe war der Chi-Quadrat Test nicht signifikant ($p=0,083$). Vergleicht man diese beiden Gruppen (Natalizumab gegen MS-Kontrollgruppe) jedoch so, dass man die Häufigkeit von Blutgruppe 0, der Häufigkeit der drei anderen Blutgruppen gegenüberstellt, zeigte sich im Chi-Quadrat Test ein signifikantes ($p=0,04$) Ergebnis.

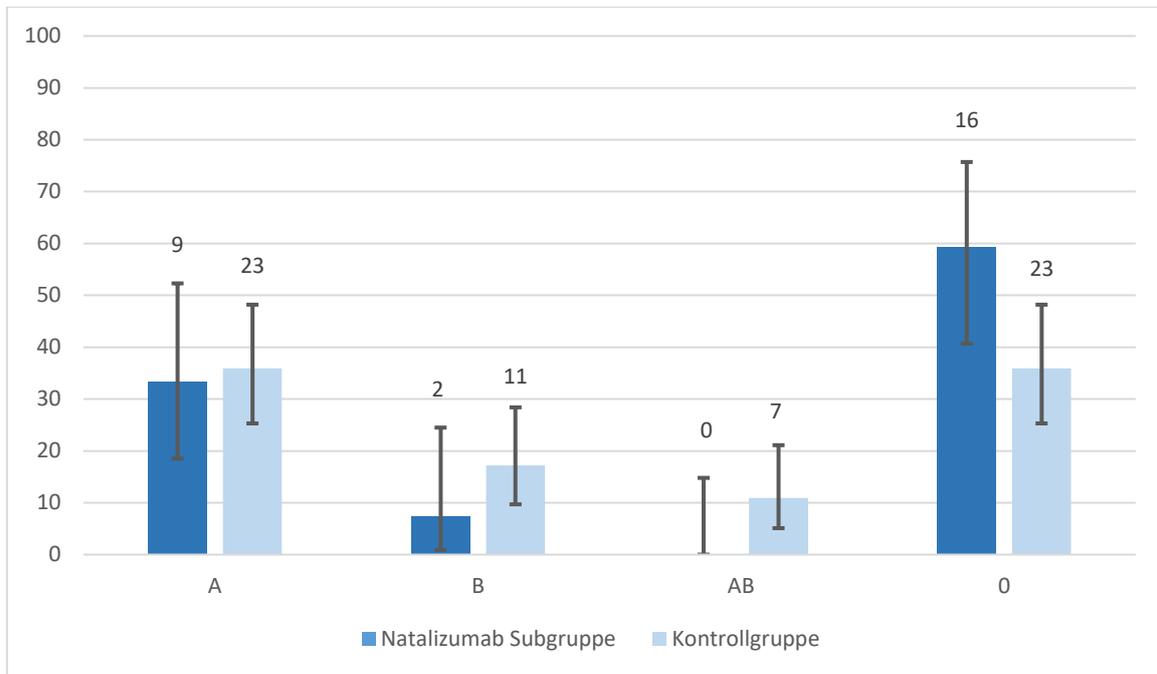


Abbildung 4: Blutgruppenverteilung in der Natalizumab Subgruppe im Vergleich mit der MS-Kontrollgruppe. Angaben in Prozent mit 95% Konfidenzintervall. Zugeordnete Zahlen stellen den absoluten Anteil dar.

4.1.4. Assoziation von Anti-JCPyV- und Anti-BKPyV-Antikörperlevel mit dem ABO-Blutgruppensystem

Bei den Patienten, bei denen Antikörperwerte gegen JCPyV und BKPyV im Serum vorlagen, wurden diese zum Diagnosezeitpunkt verglichen und geprüft, ob sich unterschiedliche Antikörperlevel, gemessen in AU [161], je nach Blutgruppe ergaben. Dieser Vergleich erfolgte sowohl für Antikörper gegen JCPyV, wie auch gegen BKPyV.

4.1.4.1. Assoziation von Anti-JCPyV-AU Werten und dem ABO-Blutgruppensystem

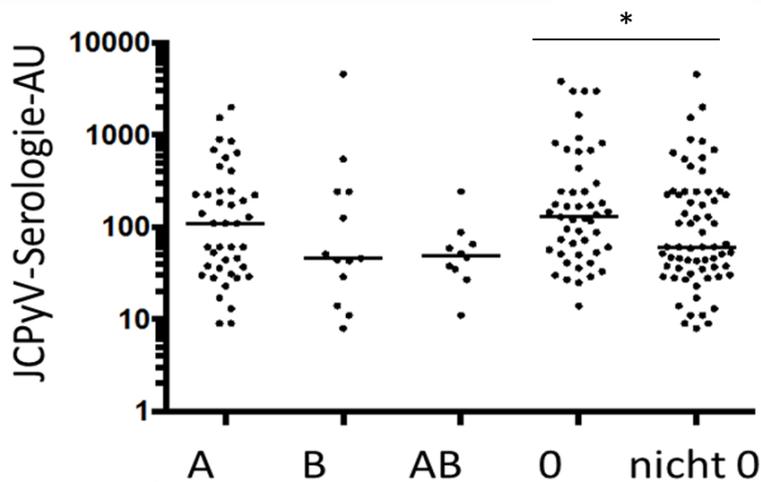
Bei 43 der PML-Patienten lag zum Diagnosezeitpunkt der PML ein serologischer JCPyV AU-Wert vor. In der MS-Kontrollgruppe lag ein solcher Wert zum Zeitpunkt der ersten Liquor- und Serumuntersuchung bei 50 Patienten vor. Da die Daten nicht normalverteilt waren, wurde bei den Berechnungen jeweils mit den Medianen gearbeitet.

Die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen, aber auch für die verschiedenen Blutgruppen sind in Tabelle 6 dargestellt. Es zeigte sich, dass der mediane Serum AU bei Patienten der Blutgruppe 0 in allen drei Aufteilungen höher als die medianen Serum AU Werte in den einzelnen anderen Blutgruppen (A, B, AB) war. Entsprechend lag auch der mediane AU der Blutgruppe 0 mit 172 AU über dem medianen AU von 152 AU aller 3 anderen Blutgruppen zusammen, ohne sich jedoch im Mann-Whitney-U Test ($Z=-1,344$, $p=0,179$) signifikant zu unterscheiden. Allerdings wurde dasselbe auch in der MS-Kontrollgruppe beobachtet (Blutgruppe 0 (Median 73), anderen Blutgruppen (Median 45)); Mann-Whitney-U Test nicht signifikant ($Z= -1,536$, $p= 0,125$)), so dass sich hier dieser Trend unabhängig bestätigt zeigte. Nimmt man die PML- und die MS-Kontrollgruppe zusammen und vergleicht den Unterschied der anti-JCPyV-Antikörper zwischen Blutgruppe 0 und den anderen drei Blutgruppen unabhängig davon, ob der Proband eine PML entwickelt hat oder nicht, zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($Z= -2.802$, $p= 0,005$) zwischen Blutgruppe 0 (Median 121) und den anderen Blutgruppen (Median 56). Die Verteilung der Anti-JCPyV Antikörperwerte im Serum, aufgeteilt nach Blutgruppen, und die Unterschiede in dieser Verteilung werden in Abbildung 5 noch einmal graphisch verdeutlicht.

Tabelle 6: Anti-JCPyV Antikörperwerte im Serum der Probanden, aufgeteilt nach Blutgruppen und Probandengruppe. Nicht 0 = alle Probanden der Blutgruppen A, B und AB; Spanne der Werte = Minimaler und Maximaler Wert in der jeweiligen Gruppe; Beide Gruppen zusammen = Probanden der PML-Patientengruppe und Kontrollgruppe zusammen, nur nach Blutgruppen aufgeteilt. AU= Arbitrary Units

	A	B	AB	Nicht 0	0
PML- Patienten					
Anti-JCPyV Antikörper in AU (Median, Spanne der Werte)	225 (9-1555)	45 (0-4578)	62 (59-66)	152 (0-4578)	172 (36-3000)
MS-Kontrollgruppe					
Anti-JCPyV Antikörper in AU (Median, Spanne der Werte)	46 (9-247)	29 (8-243)	43 (11-245)	45 (9-247)	73 (14-245)
Beide Gruppen zusammen					
Anti-JCPyV Antikörper in AU (Median, Spanne der Werte)	61 (9-1555)	44 (0-4578)	53 (11-245)	56 (0-4578)	121 (14-3000)

Abbildung 5: Verteilung der Anti-JCPyV Antikörperwerte im Serum der Probanden, PML-Patientengruppe und MS-Kontrollgruppe zusammen betrachtet. Die Werte liegen bei Blutgruppe 0 signifikant höher als bei allen anderen Blutgruppen. *signifikanter Unterschied zwischen Blutgruppe 0 und allen anderen Blutgruppen, nicht 0 = Blutgruppen A, B und AB



4.1.4.2. Assoziation von Anti-BKPyV-AU Werten und dem ABO-Blutgruppen System

Bei 43 der PML Patienten lag zum Diagnosezeitpunkt der PML ein serologischer BKPyV Antikörper Wert (AU) vor. In der MS-Kontrollgruppe lag ein solcher Wert zum Zeitpunkt der ersten Liquor- und Serumuntersuchung bei 50 Patienten vor.

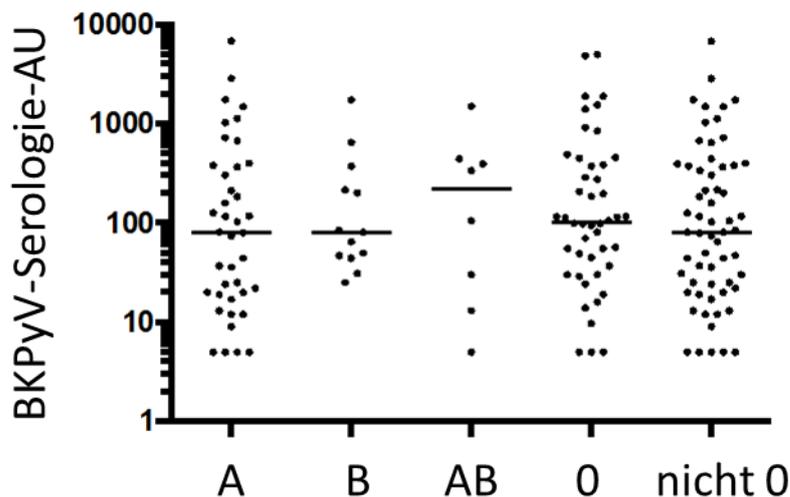
Die Unterschiede der serologischen Werte zwischen den beiden Probandengruppen, auch aufgeteilt nach Blutgruppen, sind in Tabelle 7 dargestellt. Als weitere Zeile wird in der Tabelle die Kombination der beiden Probandengruppen mit der entsprechenden Verteilung der Anti-BKPyV Antikörper Level bezogen auf die Blutgruppen dargestellt. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen dem medianen Serum-AU der Blutgruppe 0 im Vergleich zu den medianen Serum-AU Werten der anderen Blutgruppen, (sowohl A, B und AB einzeln, als auch alle drei Blutgruppen zusammen). Der Mann-Whitney-U Test ergab in der PML-Patientengruppe keinen signifikanten Unterschied ($Z = -1,781$, $p = 0,075$) zwischen den medianen Antikörperleveln von Blutgruppe 0 (Median 99) und den anderen Blutgruppen (Median 47). Auch in der Kontrollgruppe stellte sich der Unterschied der medianen Anti-BKPyV Antikörpern im Serum zwischen Blutgruppe 0 (Median 114) und den anderen Blutgruppen (Median 117) als nicht signifikant verschieden dar ($Z = -0,172$, $p = 0,864$). Der mediane Anti-BKPyV AU war bei den anderen Blutgruppen sogar höher als der mediane Serum AU bei Blutgruppe 0.

Wenn man die beiden Probandengruppen (PML-Patienten und MS-Kontrollgruppe) zusammenführt und die Anti-BKPyV Antikörperlevel all dieser Probanden nach Blutgruppen vergleicht, dann zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($Z = -1,430$, $p = 0,153$) zwischen Blutgruppe 0 (Median 106) und den anderen drei Blutgruppen (Median 80), anders als für die JCPyV Serologie. Abbildung 6 verdeutlicht die Ergebnisse der statistischen Untersuchungen und zeigt, dass die medianen Werte der Anti-BKPyV Antikörperlevel sich bei den Blutgruppen der Probanden nicht signifikant unterschieden.

Tabelle 7: Anti-BKPyV Antikörperwerte im Serum der Probanden, aufgeteilt nach Blutgruppen und Probandengruppe. Nicht 0 = alle Probanden der Blutgruppen A, B und AB; Spanne der Werte = Minimaler und maximaler Wert in der jeweiligen Gruppe; Beide Gruppen zusammen = Probanden der PML-Patientengruppe und MS-Kontrollgruppe zusammen, nur nach Blutgruppen aufgeteilt. AU= Arbitrary Units

	A	B	AB	Nicht 0	0
PML Patienten					
Anti-BKPyV Antikörper in AU (Median, Spanne der Werte)	23 (9-401)	67 (31-1735)	176 (13-338)	47 (9-1735)	99 (0-4809)
MS-Kontrollgruppe					
Anti-BKPyV Antikörper in AU (Median, Spanne der Werte)	117 (12-2846)	81 (25-373)	393 (30-1496)	117 (12-2846)	114 (14-908)
Beide Gruppen zusammen					
Anti-BKPyV Antikörper in AU (Median, Spanne der Werte)	74 (1-2846)	81 (25-1735)	222 (1-1496)	80 (1-2846)	106 (0-4809)

Abbildung 6: Verteilung der Anti-BKPyV Antikörperwerte im Serum der Probanden aus PML-Patientengruppe und MS-Kontrollgruppe. Es zeigt sich, dass die Werte in Blutgruppe 0 nicht signifikant höher oder niedriger sind als die der anderen Blutgruppen



4.2. Serologische Antikörper-Diagnostik in vom Paul-Ehrlich-Institut gemeldeten deutschen Fällen von Natalizumab-assoziiertes PML

Entsprechend der Anfrage nach Informationsfreiheitsgesetz (siehe Methoden) wurden im Zeitraum von Juli 2008 bis Juli 2017 142 Fälle von bestätigter Natalizumab-PML in Deutschland gemeldet. 36 bestätigte Fälle von PML, rapportiert an das PEI, konnten bei Erstdiagnose der PML nach oben genannten und vorab definierten Kriterien mit Daten des Instituts für Virologie, Universität Düsseldorf zusammengeführt werden. Die Patientencharakteristika dieser 36 Patienten sind in Tabelle 8 dargestellt:

Tabelle 8: Patientenkollektiv des Paul-Ehrlich Instituts

n = Patienten mit verfügbaren Daten zum jeweiligen Unterpunkt. Weiblich = absoluter und relativer Anteil an weiblichen Patienten in dieser Gruppe. Informationen zum Geschlecht lagen bei jedem Patienten vor

	n	Mittelwert	Median	Minimum	Maximum
Gesamt	36				
Weiblich	27 (75%)				
Alter	32	44	45	32	52
Größe	18	1,68	1,70	1,55	1,78
Gewicht	18	75	72	49	134
BMI	18	26,34	24,55	19,03	47,48
Zeit MS Erstdiagnose bis PML Diagnose (Monate)	29	173,79	133	25	1267
Zeit unter Natalizumab (Monate ¹)	32	52,75	49	13	103

¹ Bei 10 der 32 Patienten wurde die Dauer der Behandlung in verabreichten Dosen angegeben, bei 22 in Monaten. Da Patienten in der Regel eine Dosis pro Monat erhalten, wurde die Behandlungsdauer in Monate bei 10 von 32 Patienten über die Zahl der verabreichten Infusionen abgeschätzt

Zur Bewertung des diagnostischen Wertes der serologischen Untersuchung war insbesondere die Subgruppe von Patienten von Interesse, die zum Diagnosezeitpunkt eine

negative JCPyV-PCR aus dem Liquor oder niedrige (hier definiert als kleiner 100 Kopien/ml Liquor) aufwiesen. Tabelle 9 zeigt, dass beinahe 50% der Patienten mit vorhandenen Liquordaten zu dieser Gruppe zählen.

Tabelle 9: Zusammensetzung der Gruppen, Mittelwert, Median, Minimum und Maximum der initialen Kopienzahl von JCPyV DNA in der Liquor PCR

			JCPyV DNA in der Liquor PCR in c/ml			
	Anzahl	Weiblich	Mittelwert	Median	Min	Max
< 100 Kopien	17	14 (82,3%)	16,8	20	0	42
> 100 Kopien	19	13 (68,4%)	15.743,4	750	101	154.353

Vergleicht man die Anti-JCPyV-Serum AU-Werte von Patienten mit initial negativer/niedrig-positiven JCPyV-PCR aus dem Liquor, zeigte sich, dass die Mediane der beiden Gruppen (nicht-normalverteilte Kollektive, Mittelwert daher nicht zu verwenden) sich nicht unterschieden (Abb. 6, $Z = -0,095$, $p = 0,924$). (Abb. 7)

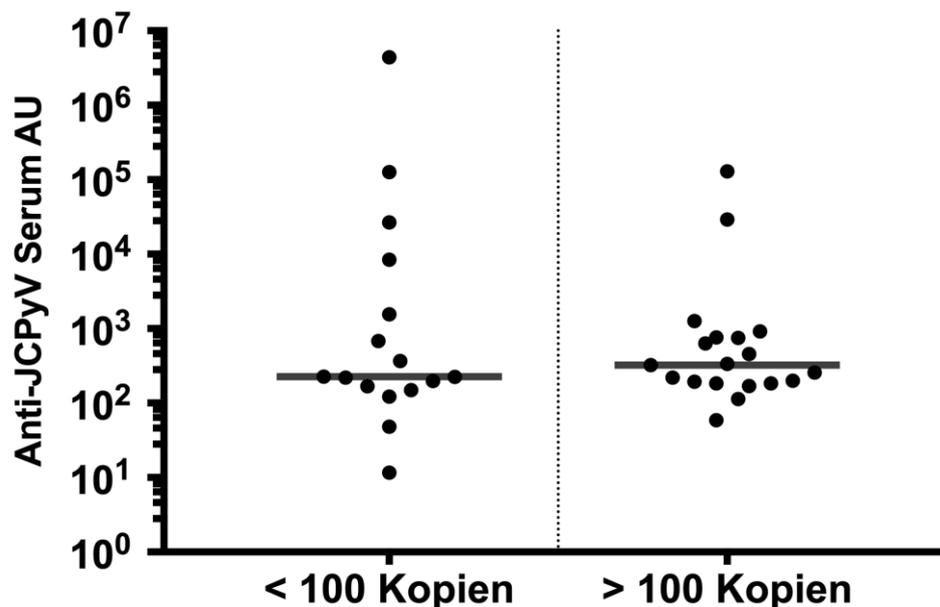


Abbildung 7: Vergleich des Anti-JCPyV Serum AU mit Median, aufgeteilt nach initialer Kopienzahl in der JCPyV-PCR aus dem Liquor. Die Gerade stellt den Median dar. Die Spannweite der 17 Werte liegt bei <100 Kopien zwischen 12 und 4.410.433, bei >100 Kopien liegt die Spannweite der 19 Werte zwischen 29 und

129.420. Die jeweiligen Mittelwerte liegen bei 305.046 (<100 Kopien) und 10.232 (>100 Kopien) und sind im Diagramm nicht dargestellt.

Vergleicht man die Anti-JCPyV-Liquor AU-Werte der Gruppen, bestand ebenfalls kein Unterschied zwischen den Medianen der beiden Gruppen (Abb. 7; $Z = -0,697$, $p = 0,486$). (Abb. 8)

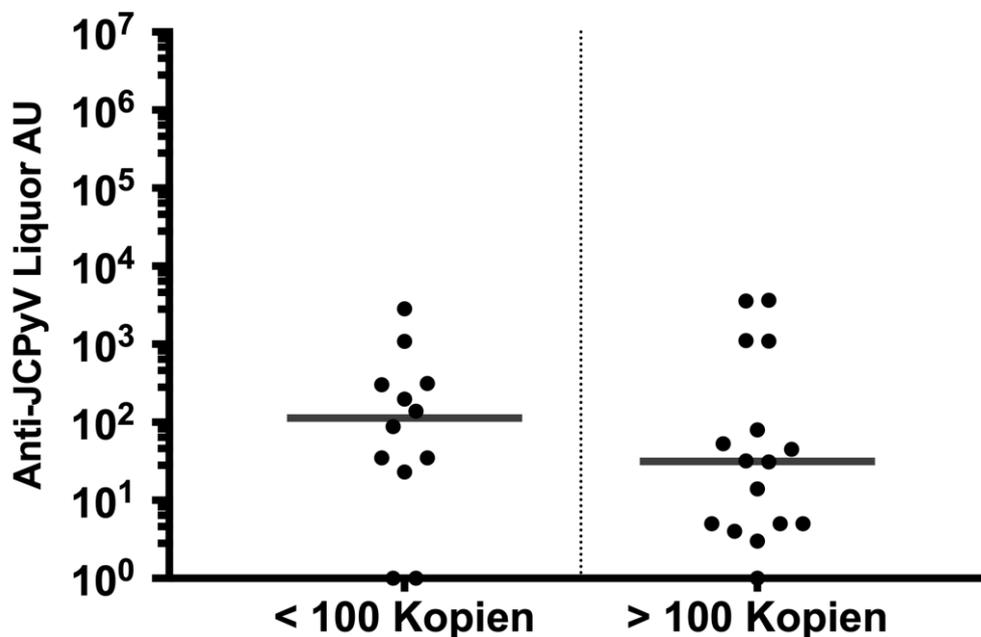


Abbildung 8: Vergleich des Anti-JCPyV Liquor AU mit Median, aufgeteilt nach initialer Kopienzahl in der JCPyV-PCR aus dem Liquor. Die Gerade stellt den jeweiligen Median dar. Die Spannbreite der 12 Werte liegt bei <100 Kopien zwischen 0 und 2838, bei >100 Kopien liegt die Spannbreite der 16 Werte zwischen 0 und 3652. Die jeweiligen Mittelwerte liegen bei 421,2 (<100 Kopien) und 607,5 (>100 Kopien) und sind im Diagramm nicht dargestellt.

ASI_{JCPyV} lagen nur bei 11 der 37 Patienten mit serologischen Werten vor. Wie in Tabelle 10 dargestellt, wurden diese ASI_{JCPyV}-Werte fast ausschließlich bei Patienten mit weniger als 100 Kopienzahlen in der initialen JCPyV-PCR aus dem Liquor bestimmt und lediglich bei einem Patienten mit einer höheren initialen Kopienzahl. Daher ist ein Vergleich der beiden Gruppen statistisch nicht aussagekräftig.

Tabelle 10: ASI_{JCPyV} Werte bei PML Diagnose gruppiert nach initialer Viruslast in der JCPyV-PCR des Liquors, N = Anzahl der vorliegenden Werte, Kopien = Anzahl der Kopien in der initialen JCPyV-PCR aus dem Liquor

	N	Median	Mittelwert	Minimum	Maximum
alle	11	2,29	8,19	1,18	48,78
<100 Kopien	10	2,02	3,12	1,18	10,3
>100 Kopien	1	48,78	48,78	48,78	48,78

4.2.1. Longitudinale Betrachtung von Patienten mit in der ersten JCPyV-PCR aus dem Liquor negativen oder niedrig positiven Befunden

Die 17 Patienten mit negativer JCPyV-PCR aus dem Liquor oder niedrigen Kopienzahlen (<100 c/ml Liquor) unterschieden sich in den in Tabelle 8 benannten Basischarakteristika wie Alter (Mittelwert 40,2 Jahre), Gewicht (Mittelwert 77kg) oder Zahl der Infusionen (Median: 45 Infusionen) nicht von der Gesamtkohorte.

Wie aus Tabelle 11 ersichtlich, erfolgte in Fällen einer niedrig-positiven oder negativen initialen JCPyV-PCR aus dem Liquor die Diagnose in 7 von 17 Fällen verzögert, trotz zumeist verdächtiger Klinik oder auffälligem MRT aufgrund einer erst zu einem späteren Zeitpunkt positiver PCR (Patienten 2, 8, 9, 11, 13, 16) sowie einem Patienten ohne positive PCR auch im weiteren Verlauf der Erkrankung trotz viermaliger Liquoruntersuchung (Patient 17). Die median Zeitverzögerung betrug 2 Monate (Range: 0,5-7 Monate bei 7 Patienten) nach dem initialen Verdacht im MRT und 2 Monate (Range 0,5-2 Monate bei 4 Patienten) nach den ersten klinischen Symptomen. Der ASI_{JCPyV} , welcher nur in 10 von 17 Fällen vorlag, war dabei in 7 Fällen (Patienten 3, 4, 6, 11, 15, 16, 17) positiv (>1.5) und in einem Fall (Patient 16) früher positiv als die PCR_{JCV} oder alleine (Patient 17) positiv bei wiederholt negativer PCR_{JCV} . Bei Patient 11 liegt laut Fallbericht ein positives JCPyV-PCR Ergebnis aus dem Liquor ohne Quantifizierung der Viruslast vor. Dieses positive JCPyV-PCR Ergebnis konnte jedoch weder zum gleichen Zeitpunkt noch zwei Monate später im Referenzlabor bestätigt werden. Dort zeigte sich die JCPyV-PCR im Liquor zu beiden Zeitpunkten negativ. Zum zweiten Messzeitpunkt zeigt sich ein positiver ASI_{JCPyV} trotz

negativer JCPyV-PCR im Liquor, welcher die lokale positive PCR zum Diagnosezeitpunkt mit einer anderen Methodik bestätigte, zumal auch eine positive Hirnbiopsie zur Diagnosesicherung vorlag.

Table 11: Longitudinale Auflistung der Patienten mit initial niedriger Kopienzahl der JCPyV-PCR aus dem Liquor. Zum ersten Untersuchungszeitpunkt sind Symptome und MRT Befunde beschrieben. Legende siehe unten

Teil1	t	Symptome	MRT	JCPyV PCR (Liquor)	ASl _{JCPyV}	Serum AU _{JCPyV}	Liquor AU _{JCPyV}
P1	Dx	Tetraparese, Sehstörung	großflächig	9	1,3	168	-
	M1			6185	-	-	-
	M6			negativ	-	-	-
P2	-M7	kognitive Defizite	unilobär	negativ	1,18	8400	35
	-M6			negativ	-	-	-
	Dx			6930	-	32580	-
	M4			14	-	-	-
	M5			8	-	-	-
	M7			14	-	-	-
	M9			negativ	-	-	-
P3	Dx	Dysarthrie, Sehstörung, Hirnnervenausfälle	großflächig	31	2,29	1555	-
	M1			242	-	-	-
	M2			-	-	-	-
	M5			negativ	-	-	-
	M14			negativ	-	-	-
P4	Dx	Hemiparese links, Doppelbilder, kognitive Defizite	multilobär	20	1,76	126300	138
	M1			negativ*	-	-	-
	M2			391	-	>max	7020
	M4			negativ	-	-	-
	M6			negativ	-	-	-
	M8			negativ	-	-	-
	M12			negativ	-	-	-
P5	Dx	Parese	multilobär	42	-	255	-
	M1			11	-	-	-
	M2			27	-	-	-
P6	Dx	kognitive Defizite	großflächig	26	3,72	26640	-
P7	Dx	Hemiparese, Hemianopsie, kognitive Defizite	multilobär	27	-	226	-
	M1			98	-	-	-
	M2			78	-	492	-
	M3			negativ	-	-	-
	M5			negativ	-	-	-

	M7			4	-	-	-
	M8			negativ	-	-	-
	M9			negativ	-	-	-
P8	-M1	Dysarthrie, Störung der Feinmotorik	multilobär	negativ	-	122	< min
	Dx			30	-	111	< min
	M1			negativ	-	32	2
	M6			negativ	-	462	313
P9	-M2	Störung Feinmotorik	multilobär	negativ	-	48	< Min
	Dx			51	1,03	181	31
	M5			negativ	-	-	-
P10	Dx	Parese rechte Hand	multilobär	20	-	4410443	-
Teil2	t	Symptome	MRT	JCV PCR (Liquor)	ASL_{JCPyV}	Serum AU_{JCPyV}	Liquor AU_{JCPyV}
P11	-M2	Tetraspastik, Hemiataxie und sensorische Ausfälle	multilobär	+*/negativ	-	-	-
	Dx			negativ	35,9	680	2838
P12	Dx	Sprachstörung, kognitive und sensible Defizite	multilobär	22	-	-	-
	M1			25	-	-	-
	M2			154	-	-	-
	M6			negativ	-	-	-
	M11			negativ	-	734	416
	M12			negativ	-	2178	646
	M18			negativ	-	-	-
P13	-M2	Sprachstörung, Gangstörung, Parästhesie linker Körper	multilobär	-	-	-	-
	Dx			27	-	150	-
	M1			198	-	-	-
	M4			18	-	676	-
	M7			negativ	-	-	-
P14	Dx	Cephalgien, kognitive Defizite, psychische Symptome	multilobär	30	-	12	-
	M3			33	-	>max	-
	M12			negativ	-	637	-
P15	Dx	Gangstörungen, Dysarthrie	multilobär	30	3	220	23
	M2			89	10,4	-	-
	M5			negativ	9,32	348	33
	M9			negativ	9,33	663	477
P16	-M1	schwere Symptome	multilobär	negativ	3,76	198	11
	Dx			37	3,67	246	32
	M1			588	6,36	972	-
	M2			37	31,47	147	861
	M2			161	18,79	1694	965
	M3			38	11,34	904	622
	M9			negativ	-	928	605
P17	Dx	asymptomatisch	großflächig	negativ	10,3	367	Nicht verfügbar
	M1			negativ	-	-	-
	M2			negativ	-	267	-
	M3			negativ	-	-	-

*Legende: P = Patient mit laufender Nummer; M = Monat vor (-) bzw. nach PML-Diagnose (Dx), definiert über die erste positive JCPyV-PCR aus dem Liquor; - = nicht durchgeführt oder nicht verfügbar; *positive Hirnbiopsie; MRT = Magnetresonanztomographie; großflächig =, ausgedehnte PML-Läsionen; multilobär = mehr als eine Hirnregion betroffen; unilobär = eine Hirnregion betroffen, +*: laut Fallberichten lag in einem lokalen Labor ein (fraglich) positives JCPyV-PCR aus dem Liquor vor, welches jedoch im Referenzlabor (Institut für Virologie Düsseldorf) nicht bestätigt werden konnte.*

Bei 16 von 17 Fällen lag mindestens ein Serum-AU_{JCV} vor. Ein Anstieg der Serum-AU_{JCPyV}-Werte konnte in 10 der 16 Fälle (Patienten 2, 4, 7, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16) beobachtet werden (medianer Anstieg um Faktor 3,39), dabei in 3 Fällen (Patienten 2, 9, 16) bevor die JCPyV-PCR aus dem Liquor positiv war oder gleichzeitig mit dem PCR-Umschlag.

Bei 6 von 17 Fällen lag mindestens ein Liquor-AU gegen JCPyV vor. Ein Anstieg der Liquor AU Werte fand sich in 6 Fällen (Patienten 4, 8, 9, 12, 15, 16) (median um den Faktor 40,93), dabei in 2 Fällen (Patienten 9 und 16), bevor die JCPyV-PCR aus dem Liquor positiv war oder gleichzeitig mit dem ersten PCR Nachweis.

Bei 10 von 17 Fällen lag mindestens ein ASI_{JCPyV} vor (analog zu den Patienten 1, 2, 3, 4, 6, 9, 11, 15, 16, 17), der in 7 von 10 Fällen positiv (<1.5) ausfiel. Nur bei zwei Patienten lagen wiederholte ASI_{JCPyV} Messungen vor.

Besonders zu beachten sind die Fälle der Patienten 16 und 17, bei denen zu Beginn der PML lediglich der radiologische Verdacht vorliegt, die Patienten jedoch keinerlei Symptome zeigen. Zusätzlich ist die JCPyV-PCR aus dem Liquor bei beiden Patienten negativ, der ASI_{JCPyV} jedoch deutlich positiv. Bei Patient 16 wird die PCR 1-2 Monate später ebenfalls positiv, PML Symptome stellen sich hier jedoch erst 2,5 Monate später ein. Der ASI_{JCPyV} war bei jeder nachfolgenden Messung ebenfalls deutlich positiv. Bei Patient 17 wurde laut Fallberichten 3,5 Monate bei weiterhin negativen PCR Ergebnissen eine Hirnbiopsie entnommen. In dieser Biopsie konnte durch das Labor des NIH (National Institutes of Health) JCPyV infizierte Zellen nachgewiesen werden, sodass die Diagnose über eine positive Radiologie und die Hirnbiopsie gestellt wurde.

5. Diskussion

5.1. Assoziation des ABO-Blutgruppen-Systems mit PML

5.1.1. Zusammensetzung der Blutgruppen

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese geprüft, ob das ABO-Blutgruppensystem mit dem PML-Risiko assoziiert. In Übereinstimmung mit der Literatur bestätigte sich ein Trend dahingehend, dass die Blutgruppe 0 in der Gruppe der PML-Patienten im Vergleich zu den Kontrollkohorten leicht überrepräsentiert ist. (46,8% PML-Patientengruppe vs. 35,9% MS-Kontrollgruppe, Natalizumab-Subgruppe 59,3%). Damit kamen wir zu ähnlichen Ergebnissen wie eine amerikanische Forschergruppe aus Boston, welche im Januar 2013 ebenfalls die Blutgruppen bei 76 amerikanischen PML-Patienten bestimmten [157]. In diesem Fall wurden die Häufigkeiten der jeweiligen Blutgruppen mit der Blutgruppenverteilung der US-amerikanischen Bevölkerung verglichen. Auch bei diesen Untersuchungen ließ sich ein Trend in Richtung einer Überrepräsentation von Blutgruppe 0 bei den PML-Patienten nachweisen. Es zeigte sich ein erhöhtes Risiko für Patienten mit Blutgruppe 0 (Odds-Ratio (OR) 1,22, 95%-Konfidenzintervall (KI) 0,72 bis 2,07) eine PML zu entwickeln. Dieses Ergebnis war jedoch nicht signifikant. Analog hierzu ist auch in unseren Untersuchungen im Vergleich von PML-Patientengruppe und MS-Kontrollgruppe das Risiko, eine PML zu entwickeln für Patienten mit Blutgruppe 0 im Vergleich zu Patienten mit anderen Blutgruppen erhöht (Odds Ratio 1,57, 95%-Konfidenzintervall 0,77 bis 3,2). Nimmt man die Bostoner Gruppe und unsere Gruppe zusammen, ergibt sich ebenfalls ein erhöhtes Risiko für Patienten mit Blutgruppe 0 (Odds-Ratio 1,38, 95%-Konfidenzintervall 0,84 bis 2,27). Diese Ergebnisse sind in Abbildung 9 dargestellt. Da die 1 in allen Berechnungen innerhalb des Konfidenzintervalls liegt, ist das erhöhte Risiko statistisch als nicht signifikant zu bewerten. In der Natalizumab-Subgruppe liegt das Risiko noch höher (Odds-Ratio 2,59, 95%-Konfidenzintervall 1,02 bis 6,52) Zusätzlich liegt 1 hier nicht im Bereich des Konfidenzintervalls, weshalb das erhöhte Risiko als signifikant zu werten ist.

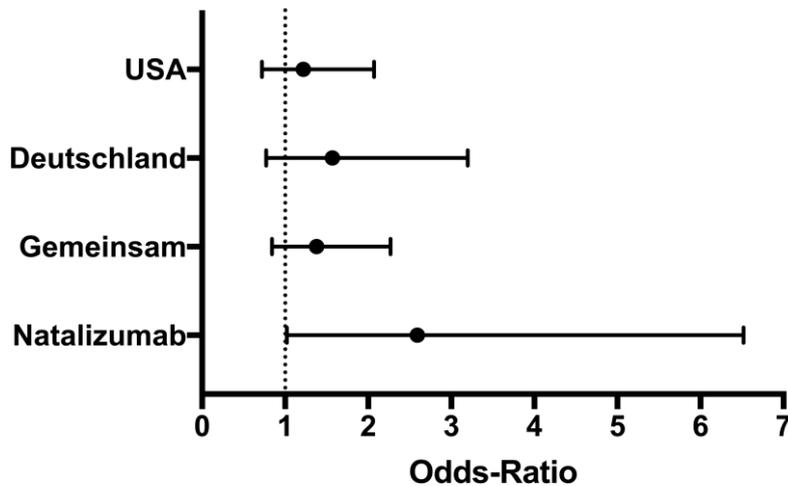


Abbildung 9: Vergleich der Odds-Ratio der verschiedenen Gruppen und nach Zusammenschluss der beiden Gruppen, jeweils berechnet über das Kreuzprodukt. Die jeweilige Odds Ratio mit 95%-Konfidenzintervall ist auf der X-Achse angegeben. **USA**= Forschergruppe aus Boston [157], **Deutschland** = PML-Gruppe und MS-Kontrollgruppe aus dieser Arbeit, **Gemeinsam** = Kombination dieser beiden Gruppen, **Natalizumab** = Natalizumab-Subgruppe im Vergleich zur MS-Kontrollgruppe

Eine von Khoury et. al. geschätzte Vorhersage aus diesen Daten war, dass man einen zusätzlichen Fall von PML pro 409 Patienten mit Blutgruppe 0 vorhersagen könne und einen PML-Fall weniger pro 310 Patienten mit Blutgruppe A [157]. Die Schlussfolgerung war auch bei dieser Untersuchung, dass größere Fallzahlen benötigt würden, um ein statistisch signifikantes Ergebnis zu erzielen. Da unsere Patientengruppen kleiner sind als die amerikanische Studiengruppe, ist es aufgrund dieser Berechnungen einleuchtend, dass unsere Testungen zu keinem signifikanten Ergebnis kommen. Da die PML eine äußerst seltene Erkrankung ist und auch an das PEI im Zeitraum von Juli 2008 bis Juli 2017 lediglich 142 Fälle Natalizumab-assoziiertes PML gemeldet wurden, ist es nahezu unmöglich, eine größere Studie mit höheren Fallzahlen und somit größerer statistischer Aussagekraft durchzuführen. Da die Erkrankung häufig fatal verläuft oder mit hoher Mortalität einhergeht, ist es außerdem oft nicht möglich, diese Untersuchungen prospektiv durchzuführen oder zusätzliche Blutproben außerhalb der klinischen Routine zu gewinnen. Die Besonderheit unserer Daten im Vergleich zu der amerikanischen Vorstudie liegen in der großen Gruppe von Patienten, die eine PML unter Behandlung mit Natalizumab erlitten hatten, während in der amerikanischen Studiengruppe nur ein Patient mit Natalizumab behandelt wurde. Das erhöhte Risiko der Natalizumab-Subgruppe ist im Vergleich zu den anderen Risikoberechnungen das einzig statistisch signifikante Ergebnis. Da Natalizumab zu einer selektiven Immunsuppression [162] und somit einem geringeren Immundefekt führt als

andere Erkrankungen, die eine PML begünstigen, könnte dies ein möglicher Grund sein, dass die Blutgruppe bei diesen Patienten eine höhere Gewichtung einnimmt.

Diverse Forschergruppen haben sich bereits mit dem Zusammenhang zwischen verschiedenen Erkrankungen (häufig infektiösen) und dem Zusammenhang der Blutgruppenverteilung befasst [163]. Hierbei wurden diverse Theorien zu Zusammenhängen mit den verschiedenen Oberflächenproteinen oder Strukturen der Blutgruppen und diversen bakteriellen und viralen Erregern aufgestellt. Da bestimmte Oberflächenproteine der Blutgruppe 0 Toxine von einigen *Vibrio cholerae* Stämmen binden können, welche das Toxin konzentrieren und zu Rezeptoren an der Darmmukosa transportieren, was für die Blutgruppen A und B nicht der Fall ist, haben Patienten mit Blutgruppe 0 ein höheres Risiko, eine Cholera sowie schwerere Verlaufsformen der Cholera zu entwickeln [164]. Die verschiedenen O-Glykane, welche entscheidend für die Bindung von *Helicobacter pylori* an die Schleimhaut des Magens sind, befinden sich in großen AB0-Epitopen. 30-50% der o-Glykane haben eine Ähnlichkeit mit dem H-Antigen, dem Oberflächenantigen der Blutgruppe 0 [165]. Zusammenhängend damit haben verschiedene Studien ein höheres Risiko für eine *Helicobacter pylori* Infektion bei Patienten mit Blutgruppe 0 detektiert [166, 167]. In der Gruppe der Viren gibt es unter anderem das Norovirus, welches Erythrozyten der Blutgruppe 0, A und AB häufiger hämagglutiniert als Erythrozyten der Blutgruppe B [168]. Die gleiche Forschergruppe zeigte in einer weiteren Studie ein erhöhtes Risiko für eine Norovirusinfektion für Patienten mit Blutgruppe 0 (OR: 11,8) und ein erniedrigtes Risiko für Patienten mit Blutgruppe B (OR: 0,09) [169].

Die Blutgruppenverteilung in Deutschland wird regelmäßig vom Deutschen Roten Kreuz (DRK) erhoben und herausgegeben. Die erhobene Verteilung aus dem Jahr 2018 ist in Abbildung 10 modifiziert dargestellt. Vergleicht man nun, ähnlich wie die amerikanischen Forscher, die eigens gemessene Blutgruppenverteilung der jeweiligen Gruppen mit dieser generellen Blutgruppenverteilung in der deutschen Bevölkerung, zeigt sich auch hier, dass Blutgruppe 0 bei den PML Patienten mit 46,7% (KI: 34,9-59,0%) häufiger auftritt als in der deutschen Bevölkerung. Analog zur Berechnung der Gruppe um Khoury et. al. zeigt sich auch hier für Patienten der Blutgruppe 0 ein erhöhtes Risiko eine PML zu entwickeln (OR 1,26, 95%-Konfidenzintervall 0,67-2,39) Da die 1 auch hier im Bereich des Konfidenzintervalls liegt, ist der Unterschied nicht statistisch signifikant.

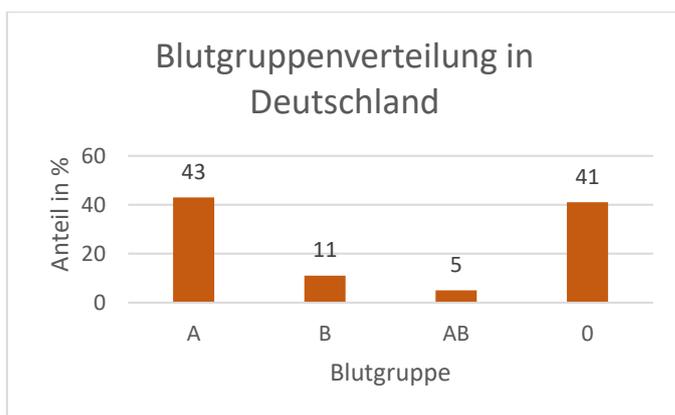


Abbildung 10: Verteilung der Blutgruppen A, B, AB und 0 in Deutschland modifiziert nach Informationen des Deutschen Roten Kreuzes (DRK). Die Anteile sind in Prozent angegeben [170]

5.1.2. Assoziation des AB0-Blutgruppensystems mit der Subgruppe der Natalizumab-PML Patienten

Der bei der Blutgruppenbestimmung beschriebene Trend, dass bei den PML Patienten ein höherer Anteil an Blutgruppe 0 vorliegt als in der MS-Kontrollgruppe, ist in der Natalizumab-Subgruppe besonders deutlich. Der Anteil an Blutgruppe 0 liegt in dieser Gruppe bei 59,3% (KI: 40,7% - 75,7%). Verglichen mit der Blutgruppenverteilung nach DRK liegt letztere jedoch ebenfalls noch im Konfidenzintervall auch dieser Subgruppe, sodass auch in diesem Vergleich kein statistisch signifikanter Unterschied vorliegt.

Im statistischen Vergleich der Natalizumab-Subgruppe mit der MS-Kontrollgruppe zeigt sich ein signifikantes Ergebnis im Chi-Quadrat Test, wenn man Blutgruppe 0 gegen die übrigen Blutgruppen stellt ($p=0,04$). Auch die Risikoberechnung, ob Blutgruppe 0 ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer PML darstellt (Odds Ratio 2,59 siehe oben), ist in der Natalizumab-Subgruppe statistisch signifikant. Dies könnte bedeuten, dass der Blutgruppeneffekt bei Patienten mit MS unter Natalizumab tatsächlich stärker wirksam ist als bei PML-Fällen anderer zugrunde liegender Erkrankungen. Bei prädisponierenden Erkrankungen für die PML, wie einer vorliegenden HIV-Infektion oder einer onkologischen Erkrankung ist hierdurch ein Großteil des Immunsystems sehr stark kompromittiert [171, 172]. Bei einer Therapie mit Natalizumab hingegen liegt eine selektive Immunsuppression vor [162], die vor allem zu einer veränderten Immunüberwachung des ZNS (Interaktion von Lymphozyten über VLA4 (alpha4beta1-Integrin) mit VCAM1) und z.B. auch im Darm (Interaktion von Lymphozyten über das alpha4beta7-Integrin mit MAdCAM1) über die dort für die Transmigration relevanten Integrine führt [173], die Lymphozytenzahl und auch die absolute CD4 Zahl im peripheren Blut sind anders als bei HIV-Patienten dagegen normal

oder sogar leicht erhöht. Ein Risikofaktor, der zur Stratifizierung des PML-Risikos herangezogen wird, ist der vorherige Einsatz von klassischen Immunsuppressiva, die zu einer generalisierten Immunsuppression führen wie Mitoxantron, Azathioprin oder Cyclophosphamid [144]. Der Einsatz dieser Immunsuppressiva vor Beginn einer Natalizumab-Therapie erhöht das Risiko für die Entwicklung einer PML im Vergleich zu Patienten ohne vorherige Immunsuppression (Hazard Ratio 1,43) und führt zum früheren Auftreten einer PML [174]. Auch eine Schwächung des Immunsystems in höherem Alter (Immunseneszenz) kann zu einem höheren PML Risiko beitragen. Im Alter nehmen die Lymphozytenzahlen im Blut der Patienten ab und sie werden anfälliger für eine durch Medikamente induzierte Lymphopenie, welche vor allem bei Medikamenten wie Fingolimod oder Dimethylfumarat beobachtet werden. Bei Natalizumab kommt es zwar zu keiner Lymphopenie im peripheren Blut, jedoch zu einem Abfall von T-Zellen im Liquor [175]. Das Risiko für die frühe Entwicklung einer PML unter Natalizumab steigt im Alter ab 50 Jahren im Vergleich zu Patienten unter 30 Jahren in einer italienischen Kohorte auf das Doppelte an (Hazard Ratio 2,11) [174], wobei dies z.B. in einer deutschen PML-Kohorte so nicht berichtet wurde [110]. Somit kann darüber spekuliert werden, ob unter selektiver Immunsuppression in einer jungen Kohorte von MS-Patienten ohne anderweitige Immunsuppression unter Natalizumab Therapie Faktoren, die das PML-Risiko wie die Blutgruppe nur gering erhöhen und z.B. bei HIV-Patienten daher weniger ins Gewicht fallen, mehr Gewicht haben könnten.

Aufgrund des Studiendesigns der retrospektiven Analyse von Proben von PML-Patienten waren die klinischen Informationen zu den Proben sehr begrenzt. Somit war es in der MS-Kontrollgruppe nicht möglich, zu sagen, ob auch ein Teil dieser Patienten mit Natalizumab behandelt wurden. Ein zusätzlicher Vergleich mit Natalizumab Patienten der MS-Kontrollgruppe, die keine PML entwickelt haben, wäre wünschenswert, um herauszufinden, ob in dieser Gruppe die Blutgruppe 0 im Vergleich zur Natalizumab-PML-Gruppe vielleicht sogar unterrepräsentiert wäre. Dieser Fakt erklärt auch die unterschiedliche Gruppengröße und Verteilung nach Alter und Geschlecht der beiden Gruppen, wie sie in Tabelle 6 dargestellt sind (Alter: 50,5 vs. 45,7, weiblich: 45,2% vs. 75,0%). Der höhere Frauenanteil in der MS-Kontrollgruppe lässt sich dadurch erklären, dass die MS-Kontrollgruppe aus MS-Patienten besteht und Frauen häufiger an MS erkranken als Männer [11], wohingegen die PML-Gruppe sowohl MS Patienten, als auch onkologische Patienten, sowie HIV Patienten einschließt, bei denen eine solche Verteilung nicht vorliegt.

Eine Auswirkung auf die Blutgruppenverteilung an sich ist durch diese Unterschiede jedoch nicht zu erwarten, da die Blutgruppenverteilung nicht durch das Geschlecht beeinflusst wird (autosomale Vererbung) und sich die Blutgruppe mit dem Alter nicht ändert, sondern während des gesamten Lebens gleich bleibt [176].

5.1.3. Assoziation des ABO Blutgruppensystems mit anti-JCPyV-Antikörperantworten

Es gibt inzwischen robuste Daten, dass die JCPyV Serologie und die Höhe der Antikörperantwort gegen JCPyV mit dem Risiko für die Entwicklung einer PML zusammenhängt, weshalb dieser serologische Parameter auch zur Stratifizierung des PML-Risikos eingesetzt wird [151, 177]. Patienten mit hohen Anti-JCPyV-Antikörperleveln haben ein höheres Risiko eine PML zu entwickeln als solche mit niedrigen Antikörperleveln. Bisher nicht untersucht ist, ob das ABO-Blutgruppensystem die Anti-JCPyV Antikörperantworten beeinflusst. Es ist theoretisch möglich, dass eine unterschiedliche Konfiguration der Erythrozyten, welche je nach Blutgruppenzugehörigkeit gegeben ist, zu unterschiedlichen Interaktionen, also zum Beispiel verstärkter oder abgeschwächter Interaktion, mit den unterschiedlichen Immunzellen des Körpers und hier insbesondere mit den Antikörper-produzierenden B-Lymphozyten führt.

In unseren Untersuchungen zeigt sich bei Betrachtung der Anti-JCPyV-AU-Werte im Serum zunächst, dass diese Werte bei den PML Patienten insgesamt höher sind als bei den Patienten der MS-Kontrollgruppe. Dies ist durch die vorhandene Infektion zu erklären und bereits so publiziert [99].

Interessanterweise zeigt sich aber zudem, dass die Serum-AU Werte gegen JCPyV bei Patienten mit Blutgruppe 0 höher sind als die der anderen Blutgruppen.

Vergleicht man zunächst die Anti-JCPyV AU-Werte der PML-Patientengruppe und der MS-Kontrollgruppe einzeln, zeigt sich in beiden Gruppen unabhängig voneinander ein Trend dahin, dass Patienten mit Blutgruppe 0 höhere Antikörperlevel gegen JCPyV haben als die Patienten der anderen Blutgruppen. Somit assoziiert die Blutgruppe 0 offensichtlich unabhängig davon, ob eine PML vorliegt oder nicht, mit der anti-JCPyV Serologie. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Berechnung, in welcher PML- und MS-Kontrollgruppe zusammen verglichen wurden. Hier zeigt sich ein signifikanter Unterschied

($p=0,005$) zwischen Blutgruppe 0 und den anderen drei Blutgruppen. Dies zeigt, dass Patienten mit Blutgruppe 0 unabhängig davon, ob sie eine PML entwickeln oder nicht, im Mittel höhere Antikörperlevel gegen JCPyV entwickeln als die Probanden mit anderer Blutgruppe. Somit könnten sie durch die höheren Antikörperlevel ein höheres Risiko für die Entwicklung einer PML aufweisen.

Bisher unpublizierte schwedische Daten unterstützen dieses Ergebnis. In genetischen Assoziationsstudien wurde die genetische Regulation der anti-JCPyV-VP1 Serumantwort (unabhängig vom Auftreten einer PML) untersucht. Hier zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer positiven Serumantwort gegen JCPyV und dem Vorliegen der Blutgruppe 0. Ein weiteres Gen, welches durch die Gruppe in Zusammenhang mit einer positiven Serumantwort gegen JCPyV gebracht wird, ist das FUT2 Gen. Hier zeigte sich, dass Probanden mit einem negativen Sekretorstatus eine höhere Wahrscheinlichkeit für eine Seropositivität haben [159].

Der Sekretorstatus wird über das FUT2 Gen reguliert. Dieses FUT2 Gen kodiert für die $\alpha(1,2)$ -Fucosyltransferase, welche in mukosalen Epithelzellen exprimiert wird und dort verschiedene Glycane modifiziert, die an der Mukosa exprimiert werden. Zu diesen Glycanen zählen unter anderem die AB0-Histoantigene (A-, B- und H-Antigen), die auf den Schleimhäuten exprimiert werden. Diese können jedoch nur exprimiert werden, wenn ein funktionales FUT2-Gen vorliegt. Können also die Antigene auf der Mukosaoberfläche exprimiert werden, gilt die Person als sekretorpositiv, ansonsten ist ihr Sekretorstatus negativ [178]. Die Forschergruppe aus Schweden vermutet einen potentiell neutralisierenden Effekt der sezernierten ABH-Antigene der Mukosa auf das JCPyV, sodass es dadurch nicht zu einem Übertritt durch die Mukosa und nicht zu einer symptomatischen Infektion kommt [159]. Da der Sekretorstatus letztendlich eine Aussage darüber trifft, ob die Blutgruppe auf der Mukosa des Patienten exprimiert wird oder nicht, unterstützen unsere Daten diese Hypothese, wonach die Blutgruppe des Patienten Auswirkung auf die Infektion und die Immunantwort gegen JCPyV hat.

Ein ähnlicher Zusammenhang zwischen Blutgruppe und Sekretorstatus, sowie einer Infektion ist bereits seit vielen Jahren bei Ulcuserkrankungen nach Infektion mit *Helicobacter pylori* bekannt. Auch hier weisen Patienten mit Blutgruppe 0 und einem negativen Sekretorstatus ein erhöhtes Risiko für die Infektion und die Entwicklung eines Ulcus auf [179-181].

Insgesamt deuten unsere Untersuchungen darauf hin, dass das ABO-Blutgruppensystem einen Einfluss auf das PML-Risiko nimmt und Blutgruppe 0 mit einem höheren PML-Risiko assoziiert ist. Des Weiteren zeigen unsere Daten, dass diese Einflussnahme anscheinend abhängig von der Serologie, also der Antikörperantwort auf das JCPyV geschieht. Der genaue Mechanismus ist bisher jedoch nicht bekannt. In weiteren Studien und Untersuchungen sollten diese Zusammenhänge genauer erforscht werden, um eine eventuell bestehende Interaktion der Blutgruppe und der JCPyV-gerichteten Immunität besser zu verstehen. Insgesamt ist diese Forschung klinisch relevant, da hierüber eine individualisierte MS Therapie mit dem Ziel der Reduktion des Risikos für eine schwerwiegende Nebenwirkung unter Natalizumab-Therapie gelingen könnte

5.1.4. Assoziation des ABO-Blutgruppen-Systems mit der anti-BKPyV Serologie

Im Gegensatz zu den Antikörperleveln gegen JCPyV zeigt sich bei den Antikörperleveln gegen BKPyV kein Unterschied zwischen Blutgruppe 0 und den anderen Blutgruppen. Dies gilt sowohl für die PML Gruppe und die MS-Kontrollgruppe separat wie auch für beide Gruppen zusammen betrachtet. Die Blutgruppe AB weist in dieser Kombination sogar einen Trend zu höheren Antikörperleveln auf als Blutgruppe 0, ein signifikanter Unterschied besteht jedoch auch hier nicht. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das ABO-Blutgruppensystem spezifisch mit der anti-JCPyV Antikörperantwort interagiert, nicht jedoch mit BKPyV, trotz der nahen Verwandtschaft und der hohen Homologie beider Polyomaviren [182]. Allerdings unterscheiden sich das JCV und das BKV in ihrem Zellrezeptor, an dem sie binden. Während das JCV an Serotonin-Rezeptoren bindet, scheint das BKV an Ganglioside zu binden [183]. Dies spricht für die virusspezifische Regulation und gegen ein allgemeines Phänomen, welches auch für andere Viren reproduziert werden könnte [184]. Die oben bereits beschriebene Forschergruppe aus Schweden konnte allerdings ihre Ergebnisse für das BKPyV teilweise reproduzieren. Auch bei BKPyV zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen einem negativen Sekretorstatus und der Seropositivität für Anti-BKPyV-VP1 Antikörper. Dies führt die Gruppe auf die hohe Homologie von JCPyV und BKPyV (75% des Genoms von JCPyV sind identisch zu BKPyV [182]) zurück. Unterstützt wird diese Hypothese durch einen nicht bestehenden Zusammenhang der Gene beim HPyV6 [159]. Der Zusammenhang zwischen Blutgruppe 0 und dem Serostatus ist beim BKPyV jedoch nicht signifikant, was wiederum unsere

Ergebnisse unterstützt, dass der Zusammenhang zwischen Blutgruppe 0 und einer Infektion auf das JCPyV beschränkt ist und nicht auf das BKPyV übertragen werden kann.

5.2. Die Bedeutung der Polyomavirus-Serologie für deutsche Fälle Natalizumab-assoziiertes PML gemeldet an das Paul-Ehrlich-Institut

Die Diagnosekriterien für die PML wurden im Jahr 2013 von der Gruppe um Berger et. al. zusammengefasst. Als Goldstandard der Diagnostik gilt danach weiterhin der direkte Nachweis von JCPyV in einer Hirnbiopsie mittels Immunhistochemie, in-Situ Hybridisierung, in-Situ PCR [185] sowie PML/JCPyV typische pathologische Veränderungen in dieser Biopsie. Hirnbiopsien werden jedoch selten durchgeführt und wurde lediglich bei einem der 36 Patienten, die in diese Arbeit eingeschlossen wurden, durchgeführt (Patient 17). Weiterhin beschreibt die Gruppe als weiteres, übergeordnetes Diagnosekriterium vor allem die quantitative JCPyV-PCR aus dem Liquor des Patienten [101]. Wird JCPyV-DNA aus dem Liquor bei Patienten mit klinischen Zeichen und MRT-Verdacht auf PML nachgewiesen, ist eine PML ebenfalls diagnostiziert. In Tabelle 2 (siehe oben) ist die Sicherheit der PML-Diagnose je nach Ergebnis von klinischen Befunden, MRT und Liquor dargestellt.

In der rezenten Publikation zu den 142 Fällen von Natalizumab-assoziiertes PML bis Juli 2017 in Deutschland sticht heraus, dass die für die Diagnose entscheidende JCPyV-PCR aus dem Liquor [101] in der ersten Liquoruntersuchung zum ersten Untersuchungszeitpunkt zu >20% zunächst negativ ausfiel und das im Falle einer positiven PCR die quantitative Analyse in knapp 30% der Fälle Werte von <100 c/ml ergab [110]. Dass die Untersuchungen zum JCPyV DNA-Nachweis oft an der Detektionsgrenze der Methodik liegen, zeigte sich bei Blankenbach et al. auch daran, dass teils in denselben Proben, die in unterschiedlichen Laboren untersucht wurden, nur in einem ein positiver Virusnachweis, in einem anderen dagegen kein Virusnachweis gelang. Die Sensitivität der JCPyV-PCR aus dem Liquor ist entsprechend gerade in Stadien der frühen PML limitiert. Dies rechtfertigt die genauere Analyse auch serologischer Untersuchungen zu den in Blankenbach et al. berichteten Fällen deutscher PML-Fälle, die den zweiten Teil dieser Arbeit bildeten.

Bei 36 der in Blankenbach et. al. berichteten Fälle gelang es, über die im Methodenteil dieser Arbeit vorab definierten Kriterien die am Institut für Virologie im Rahmen der Routine erhobenen Werte der Polyomavirus-Serologie zuzuordnen. Hier war es erwartungsgemäß

so, dass mehr als die Hälfte, nämlich 17 Patienten, eine sehr niedrige initiale Kopienzahl im Liquor aufwiesen. Dabei sind diese Kopienzahlen nicht nur unter 100 c/ml, der Höchstwert bei diesen 17 Patienten liegt bei 42 c/ml, eine Kopienzahl welche in vielen kommerziellen Laboratorien nicht zuverlässig nachgewiesen wird und in Düsseldorf aufgrund eines PCR-Protokolls ähnlich dem des amerikanischen Referenzlabors am NIH [175] detektiert werden kann.

Sechs der 17 Fälle, deren Verläufe im Ergebnisteil dargestellt sind, wurden bereits zuvor in Warnke et. al. besprochen [116] und werden in Tabelle 12 zugeordnet aufgelistet.

Tabelle 12: Zuordnung der Patienten aus unseren Untersuchungen zu den Fällen der Studie um Warnke et. al.

Patienten dieser Arbeit	Patienten der Gruppe um Warnke et.al. [116]
Patient 1	Case 2
Patient 3	Case 5
Patient 4	Case 6
Patient 6	Case 11
Patient 9	Case 10
Patient 11	Case 17

Neu im Vergleich zu der publizierten Arbeit war neben der Betrachtung weiterer neuer Fälle und longitudinaler Verläufe, die zusätzliche Möglichkeit, in dieser Arbeit nun auf die klinischen Daten aus den Fallberichten des PEI zurückgreifen zu können (Blankenbach et al.). Hier lagen neben klinischen Daten auch die Beschreibungen von MRT-Befunden vor und es bestand die Möglichkeit, die serologischen Untersuchungen aus Düsseldorf zeitlich in Bezug auf Krankheitsbeginn (erste Symptome, erste Veränderungen in der MRT) und PCR-Ergebnisse aus verschiedenen Labors zu bewerten.

Hierbei besteht keine Korrelation zwischen Anzahl und Ausprägung der Symptomatik und den JCPyV-PCR Ergebnissen aus dem Liquor. Patienten mit zahlreichen und zum Teil auch schweren Symptomen (P16) weisen teils negative PCR-Ergebnisse auf. Dies kann die Diagnose der PML und Abgrenzung von MS-bedingter Krankheitsaktivität erschweren.

Zusätzliche Informationen lieferten die MRT Befunde, welche sowohl zum Zeitpunkt der Diagnose als auch im Verlauf in den Fallberichten beschrieben waren und in Tabelle 11 vereinfacht als unilobär, also eine betroffene Hirnregion (1 Patient), multilobär, also mehr als eine betroffene Hirnregion (12 Patienten) und großflächig, also ausgedehnte PML Läsionen (4 Patienten) beschrieben sind. Hier zeigt sich bei geringer Fallzahl ein Trend,

nämlich dass das JCPyV-PCR Ergebnis aus dem Liquor bei ausgeprägteren Befunden eher positiv ist als bei weniger ausgeprägten (unilobär zunächst negativ, großflächig: in 75% direkt positiv, multilobär: in 66% direkt positiv). Gestützt werden kann dieser Trend durch Untersuchungen der Gruppe um Wijburg et. al., welche ebenfalls einen Zusammenhang zwischen der MRT Bildgebung von PML-Läsionen und der JCPyV-PCR aus dem Liquor feststellen konnte. Hier zeigte sich eine statistisch signifikante positive Korrelation zwischen dem Volumen der PML Läsionen im MRT und der Kopienzahl der JCPyV-PCR aus dem Liquor. Patienten mit kleinen Läsionen wiesen eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für negative PCR Ergebnisse auf [186].

Die Follow-Up Informationen aus den Fallberichten zeigen, dass keiner der 17 Patienten im Verlauf dieser Berichte (Follow Up Zeit durchschnittlich 16,5 Monate, Zeitspanne 1-26 Monate) verstorben ist und die Morbidität der PML in dieser Kohorte somit deutlich geringer ist als allgemein bei Natalizumab-assoziiierter PML gesehen (20%, siehe Einleitung). Jedoch haben auch in dieser Gruppe knapp 47% schwerere Residuen zurück behalten, was mit den Zahlen aus anderen Studien übereinstimmt [137].

5.2.1. Serum-AU Werte der anti-JCPyV-Serologie bei Fällen von PML aus Deutschland

Aus der Literatur ist bekannt, dass höhere anti-JCPyV-Antikörperlevel im Blut mit einem höheren Risiko einer PML assoziieren [177, 187, 188].

Analog hierzu waren auch bei Fällen von PML mit niedriger Kopienzahl von JCPyV-DNA im Liquor, die von besonderem Interesse in dieser Arbeit waren, in jedem Fall anti-JCPyV Antikörper im Serum nachweisbar. Zudem zeigt sich, dass die Serum-AU Werte im Verlauf der Erkrankung ansteigen (median um den Faktor 3,39) und dies in einigen Fällen (4 Fällen) sogar bevor die JCPyV-PCR aus dem Liquor überhaupt positiv wird.

Dies könnte darauf hindeuten, dass es als Korrelat einer Aktivierung der JCPyV-Infektion, Infektion des Gehirns oder Re-Infektion zu einem Anstieg der Serumantwort kommt, die möglicherweise einen prädiktiven Wert für ein erhöhtes Risiko haben könnte, zeitnah eine PML zu entwickeln. Ähnliches konnte bei 5 Patienten einer schwedischen Kohorte beobachtet werden. Hier zeigte sich bei Diagnose der PML ein Anstieg der Anti-JCPyV Antikörperlevel, während dies bei Natalizumab-Patienten ohne Entwicklung einer PML nicht beobachtet werden konnte [189]. Eine ähnliche Reaktion konnte im gleichen Zeitraum

für Antikörper gegen andere Viren, wie Cytomegalievirus (CMV) und das Varizella-Zoster-Virus (VZV), nicht gezeigt werden. Es könnte entsprechend sinnvoll sein, in einer größeren Folgestudie zu untersuchen, inwieweit neben dem absoluten Wert der JCPyV-Serologie, gemessen mit dem kommerziellen ELISA (Stratify-JCPyV) und den sogenannten Index-Werten, auch die Veränderung der Antikörperlevel über die Zeit, z.B. als Rate der Veränderung über die Zeit, nutzbar gemacht werden könnte für eine genauere Risikovorhersage.

Interessanterweise unterschieden sich die medianen Serum AU Werte bei Patienten mit höheren Kopienzahlen aus dem Liquor ($>100\text{c/ml}$ JCPyV DNA) im Vergleich zu Patienten mit niedrigen Kopienzahlen nicht, was dafür spricht, dass eine hohe Replikationsrate im Gehirn nicht zwangsläufig auch zu hohen absoluten Anti-JCPyV-Antikörperleveln im Blut führen muss.

5.2.2. Liquor-AU Werte der anti-JCPyV-Serologie bei Fällen von PML aus Deutschland

Ähnlich wie für die Serum-AU-Werte findet sich auch für die Liquor-Anti-JCPyV-AU Werte keine Korrelation mit den Liquor-JCPyV-PCR-Ergebnissen für die 28 Patienten, bei denen diese Werte mindestens einmal vorliegen.

Betrachtet man jedoch die Verläufe der Patienten mit sehr niedrigen Kopienzahlen in Tabelle 11 für sich gesehen, so zeigt sich hier ein medianer Anstieg des Liquor-AU um den Faktor 40,93, welcher deutlich höher ist als der mediane Anstieg des Serum-AU im gleichen Zeitraum. Zusätzlich zeigt sich ein Anstieg des Liquor-AU bei zwei dieser Patienten, noch bevor die PCR von negativ auf einen niedrig positiven Wert steigt. Ein Anstieg des Liquor-AU allein ist jedoch als zusätzliches Kriterium zur Diagnose der PML wenig geeignet, da hier unberücksichtigt bleibt, ob parallel eine Schrankenstörung vorliegt, also eine vermehrte Durchlässigkeit für größere Moleküle im Rahmen einer Entzündung der ansonsten sehr selektiven Blut-Hirn-Schranke [190]. Deshalb sind diese Anstiege des AU-Wertes im Liquor allein betrachtet nur bedingt aussagekräftig und die Berechnung des unten genannten ASI-JCPyV ist erforderlich, der die Albumin- und IgG-Gesamtwerte aus Blut und Urin berücksichtigt.

Der mögliche ergänzende Wert von anti-JCPyV-Antikörpern aus dem Liquor zur PML-Diagnostik wurde außer in der Arbeit von Warnke et al. 2014 z.B. auch von einer Forschergruppe aus New York in einem Paper aus dem Jahr 2012 diskutiert [150]. Diese Gruppe verglich den Zusammenhang zwischen Serum-AU und Liquor-AU als Screening-Methode bei Natalizumab-behandelten Patienten im Rahmen eines PML-Monitoring Programms. Hier zeigt sich eine Überlegenheit des Liquor-AU gegenüber dem Serum-AU, da teilweise hoch positive Liquorwerte bei negativen Serumwerten vorliegen. Zusätzlich zeigt sich bei zwei Patienten mit initial bereits hohen Liquor-AU Werten ein zusätzlich starker Anstieg des Liquor-AU bei Entwicklung einer tatsächlichen PML [150]. Eine Limitation dieser Diagnostik, die ebenfalls im Artikel beschrieben wird, ist die Durchführbarkeit der Liquordiagnostik. Bei PML-Verdacht können die Werte problemlos erhoben werden, da im Rahmen der JCPyV-PCR-Diagnostik ohnehin Liquor entnommen werden muss, im Rahmen der Risikostratifizierung der PML ist eine regelmäßige Liquorpunktion aufgrund des Risiko-Nutzenverhältnisses jedoch nicht praktikabel.

5.2.3. ASI_{JCPyV} Verläufe der anti-JCPyV-Serologie bei Fällen von PML aus Deutschland

Die oben beschriebene New Yorker Forschungsgruppe legt einen moderaten Zusammenhang zwischen den Serum-AU Werten und den Liquor-AU Werten nah [150], weshalb die Etablierung eines Wertes, welcher diese beiden Messwerte in einen Zusammenhang beziehungsweise das Verhältnis der beiden Werte setzt, sinnvoll macht.

Wie bereits von der Gruppe um Warnke et. al. beschrieben, könnte ein ASI_{JCPyV} von mehr als 1,5 für eine intrathekale Synthese von Antikörpern sprechen [116], einen diagnostischen Zugewinn zu diesen Kriterien bringen und die Diagnose der PML auch bei niedrigen Kopienzahlen in der PCR ermöglichen. Zur Bestimmung des ASI_{JCPyV} benötigt man die Antikörper-Level gegen JCPyV in Serum und Liquor (Serum-AU und Liquor-AU), einen individuellen Albumin-Quotienten, der aus der Albumin Konzentration im Liquor und der im Serum berechnet wird, sowie der absoluten IgG Konzentration im Serum und im Liquor. Albumin und Gesamt-IgG werden hierbei über Immunephelometrie bestimmt.

In den hier analysierten Fällen war der ASI_{JCPyV} bei 2 Patienten positiv vor der PCR. Insgesamt zeigt sich ein Trend, dass der ASI_{JCPyV} bei einigen Patienten eine zusätzliche diagnostische Sicherheit liefert, wenn der ASI_{JCPyV} bei niedrigen Kopienzahlen positiv ist. Bei zwei der Patienten bestätigt er sogar die Diagnose bei initial negativen Kopienzahlen

und in einem Fall sogar negativer Klinik. Hier kann eine Therapie eingeleitet werden, bevor Patienten überhaupt symptomatisch werden und somit könnten schwerere neurologische Defizite erspart werden. In der Einleitung ist bereits beschrieben, dass Patienten, welche zum Zeitpunkt der Diagnose asymptomatisch sind, ein besseres Outcome haben als symptomatische Patienten [139]. Würde der ASI_{JCPyV} als diagnostisches Kriterium hinzugezogen, weisen unsere Beobachtungen darauf hin, dass der ASI_{JCPyV} bei asymptomatischen Patienten mit verdächtiger Bildgebung und niedrigen Kopienzahlen einen wertvollen diagnostischen Zugewinn hat und dass gegebenenfalls mehr Patienten mit einer PML diagnostiziert und therapiert werden könnten, die noch keine klinischen Symptome aufweisen.

Betrachtet man den ASI_{JCPyV} im Zusammenhang mit der Bildgebung, zeigt sich, dass der ASI_{JCPyV} meist direkt positiv ist, wenn mehrere oder großflächige Läsionen vorliegen. Bei multilobären Läsionen ist der ASI_{JCPyV} in 80% der Fälle direkt positiv, bei großflächigen Läsionen in 75%. In dem Fall, in dem eine unilobäre Läsion im MRT nachgewiesen wurde, war der ASI_{JCPyV} negativ. Es zeigt sich in Bezug auf den Zusammenhang zwischen MRT und ASI_{JCPyV} ein ähnlicher Trend wie im Zusammenhang von JCPyV-PCR aus dem Liquor und MRT. Dies unterstützt unsere oben aufgestellte Hypothese, dass der ASI_{JCPyV} bei verdächtiger Bildgebung zusätzlich bestimmt werden sollte.

Es sollte daher diskutiert werden, ob der ASI_{JCPyV} mit in die diagnostischen Kriterien zur Diagnose der PML aufgenommen werden sollte.

5.3. Limitationen der Arbeit

Eine grundlegende Limitation, welche sich durch alle Untersuchungen dieser Arbeit zieht ist, dass es durch die niedrigen Patientenzahlen, welche bei der PML vorliegen, schwierig ist, ausreichend große Gruppen von Patienten zu untersuchen. Das erklärt, weshalb in dieser Arbeit vielfach auch Trends diskutiert werden, da die Studie an einigen Stellen keine ausreichende Fallzahl einschloss, um signifikante Ergebnisse zu erhalten. Allerdings ist dies darin begründet, dass die PML eine sehr seltene Erkrankung ist und für die im Fokus der Arbeit stehende Subgruppe der Natalizumab-assoziierten PML in den Jahren seit Zulassung bis Juli 2017 in Deutschland an das PEI lediglich 142 Fälle gemeldet wurden. Immerhin lagen für den statistischen Teil der Arbeit über beide Teile gerechnet rund 38 % aller deutschen Natalizumab-PML-Fälle vor, was sie trotz Limitationen zur aussagekräftigsten Arbeit dieser Art mit Untersuchungen zur JCPyV-Serologie macht.

Da eine strukturierte Katalogisierung der serologischen Untersuchungen am Institut für Virologie erst in den Jahren 2013 und 2014 erfolgte, gelang es nicht zu allen Patienten, deren Blutgruppen bestimmt werden konnten, auch serologische Untersuchungsergebnisse zuzuordnen.

In der Gruppe der PML-Patienten lagen nicht zu allen Patienten genaue Informationen vor, was die zugrunde liegende Immunsuppression/Erkrankung war, die zur PML geführt hat. Daher ist unklar, ob noch weitere der 23 nicht definierten Patienten ebenfalls mit Natalizumab therapiert wurden. In der MS-Kontrollgruppe wurde ebenfalls keine Subgruppierung durchgeführt, sodass nicht auszuschließen ist, dass einige der Kontrollpatienten ebenfalls mit Natalizumab therapiert wurden.

Von insgesamt 142 vorliegenden PML Fällen, welche durch das PEI übermittelt wurden, konnten nur 36 Patienten zu serologischen und liquorspezifischen Labordaten des Instituts für Virologie zusammengeführt werden. Dies liegt unter anderem daran, dass nur ein Teil der Fälle (zumeist solche, die in lokalen Laboren trotz hartem Verdacht auf PML eine negative JCPyV PCR aufwiesen) überhaupt in Düsseldorf untersucht wurden. Zudem wurden von vielen Zuweisern lediglich Liquorproben zur PCR eingeschendet, jedoch kein Serum zur Bestimmung von Antikörperleveln. Somit konnten viele der Patienten in unsere serologischen Untersuchungen nicht mit einbezogen werden.

Ein zusätzliches Problem bei der Bestimmung des ASI_{JCPyV} ist, dass zusätzlich Albumin und IgG Werte in Serum und Liquor bestimmt werden müssen. Diese werden, falls

überhaupt vorhanden, jedoch nicht standardmäßig von den zuweisenden Ärzten übermittelt. Dies ist in unseren Untersuchungen nur bei 10 von 36 Patienten erfolgt. Würden diese Untersuchungen standardmäßig bei Patienten mit PML Verdacht durchgeführt und der ASI_{JCPyV} regelhaft am Institut für Virologie berechnet, könnte man wahrscheinlich validere Aussagen bezüglich der Aussagekraft des ASI_{JCPyV} Wertes treffen.

6. Schlussfolgerung

Das bei MS gut wirksame Medikament Natalizumab ist auch viele Jahre nach der Wiedertzulassung weiterhin mit dem erhöhten Risiko der Entwicklung einer PML assoziiert.

Der erste, experimentelle Teil dieser Arbeit zeigt, dass vor Beginn einer Therapie mit Natalizumab zusätzlich zu den etablierten Risikofaktoren, wie ein positiver Anti-JCPyV-Antikörper und eine vorherige Immunsuppression, auch die Blutgruppe und hierbei insbesondere Blutgruppe 0 als Risikofaktor für die Entwicklung einer PML in Erwägung gezogen werden sollte. Die Blutgruppe 0 wies in der Gruppe der PML-Patienten und insbesondere in der Subgruppe der Natalizumab-assoziierten PML einen höheren Anteil auf als in der MS-Kontrollgruppe. Unsere Untersuchungen zeigten außerdem höhere Anti-JCPyV-Antikörperlevel bei Patienten mit Blutgruppe 0 im Vergleich zu Patienten mit anderen Blutgruppen. Die höheren Antikörperlevel waren hierbei auf das JCPyV isoliert und konnten nicht für andere Viren, wie das BKPyV reproduziert werden. Dieser Trend war dabei nicht nur auf die Patienten begrenzt, die eine PML entwickelten, sondern auch Patienten der MS-Kontrollgruppe mit Blutgruppe 0, die keine PML entwickelten wiesen höhere Antikörperlevel auf. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die zugrunde liegenden Prozesse genauer zu verstehen und die klinische Relevanz zu prüfen.

Im zweiten, statistischen Teil dieser Arbeit konnten bereits publizierte Theorien [110, 116] zum diagnostischen Wert von serologischen Untersuchungen untermauert werden. Dies gelang durch unsere Kombination aus serologischen Untersuchungen des Instituts für Virologie und klinischen Daten in Form von Fallberichten des PEI. Es bestätigte sich, dass die JCPyV-Serologie und hierbei insbesondere der ASI_{JCPyV} ein bisher nicht genutztes Potential bei der Diagnose der PML im Fall von klinischem Verdacht oder auffälliger Bildgebung bei gleichzeitig negativer oder uneindeutiger Liquordiagnostik darstellt. Unsere Ergebnisse sollten in einer unabhängigen Kohorte validiert werden, um anschließend in einen neuen diagnostischen Algorithmus bei Verdacht auf PML integriert werden zu können, letztendlich mit dem Ziel, die Diagnose der PML frühzeitiger und sicherer stellen zu können.

7. Literaturverzeichnis

1. Warnke C, H.J., Kitzrow M, Biesalski A, Knauss S, *Entzündliche Erkrankungen-Multiple Sklerose*, in *Neurologische Pathophysiologie*, D. Sturm, Biesalski, Anne-Sophie, Höffken, Oliver Editor. 2019, Springer-Verlag Berlin Heidelberg: Berlin Heidelberg. p. 53-62.
2. Compston A, C.A., *Multiple sclerosis*. *Lancet*, **2008**. 372(9648): p. 1502-1517.
3. Adrian-Min u m her C rist Mahler n d M. Kerschesteiner, *Pathologie und Pathogenese der progredienten Multiplen Sklerose: Konzepte und Kontroversen*. *Aktuelle Neurologie*, **2017**. 44(7): p. 476-488.
4. Warnke, C., B.C. Kieseier, and H.-P. Hartung, *Biotherapeutics for the treatment of multiple sclerosis: hopes and hazards*. *Journal of Neural Transmission*, **2013**. 120(1): p. 55-60.
5. The International Multiple Sclerosis Genetics, C., et al., *Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis*. *Nature*, **2011**. 476: p. 214.
6. Popescu BF, L.C., *Pathology of demyelinating diseases*. *Annual Review of Pathology*, **2012**. 7: p. 185-217.
7. Frischer JM, B.S., Dal-Bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, Sorensen PS, Lassmann H, *The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains*. *Brain*, **2009**. 132(Pt.5): p. 1175-1189.
8. CBjartmar, J.R., B.Trapp, *Axonal loss in the pathology of MS: consequences for understanding the progressive phase of the disease*. *Journal of the Neurological Sciences*, **2003**. 206(2): p. 165-171.
9. Frohman EM, R.M., Raine CS, *Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis*. *New England Journal of Medicine*, **2006**. 354(9): p. 942-955.
10. Sobel, R.A., *Demyelinating diseases Greenfield's Neuropathology*. **2008**. 1513.
11. Kingwell E, M.J., Jetté N, Pringsheim T, Makhani N, Morrow SA, Fisk JD, Evans C, Béland SG, Kulaga S, Dykeman J, Wolfson C, Koch MW, Marrie RA., *Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Europe: a systematic review*. *BMC neurology*, **2013**. 13(128).
12. Wiendl H, K.B., *Multiple Sklerose. Klinik, Diagnostik und Therapie*. 1 ed. *Klinische Neurologie*. **2010**: Kohlhammer. 229.
13. H, W., *Nature plus nurture: the triggering of multiple sclerosis*. *Swiss medical weekly*, **2015**. 145.

14. Sadovnick AD, A.H., Rice GP, Bulman D, Hashimoto L, Paty DW, Hashimoto SA, Warren S, Hader W, Murray TJ, *A population-based study of multiple sclerosis in twins: update.* Annals Neurology, **1993**. 33(3): p. 281-285.
15. *Familial risk of multiple sclerosis: a nationwide cohort study.* American Journal of epidemiology, **2005**. 162(8): p. 774-778.
16. Consortium, I.M.S.G., *Low-Frequency and Rare-Coding Variation Contributes to Multiple Sclerosis Risk.* Cell, **2018**. 175(6): p. 1679-1687.e7.
17. Lincoln MR, M.A., Cader MZ, Saarela J, Dymment DA, Tiislar M, Ferretti V, Tienari PJ, Sadovnick AD, Peltonen L, Ebers GC, Hudson TJ, *A predominant role for the HLA class II region in the association of the MHC region with multiple sclerosis.* Nature genetics, **2005**. 37(10): p. 1108-1112.
18. Binder, M.D., et al., *Common and Low Frequency Variants in MERTK Are Independently Associated with Multiple Sclerosis Susceptibility with Discordant Association Dependent upon HLA-DRB1*15:01 Status.* PLoS Genet, **2016**. 12(3): p. e1005853.
19. *Low-Frequency and Rare-Coding Variation Contributes to Multiple Sclerosis Risk.* Cell, **2018**. 175(6): p. 1679-1687.e7.
20. GC, E., *Environmental factors and multiple sclerosis.* Lancet Neurology, **2008**. 7(3): p. 268-277.
21. Simpson S Jr, B.L., Otahal P, Van der Mei I, Taylor B, *Latitude is significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: a meta-analysis.* journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry, **2011**. 82(10): p. 1132-1141.
22. Makhani, N., et al., *MS incidence and prevalence in Africa, Asia, Australia and New Zealand: A systematic review.* Mult Scler Relat Disord, **2014**. 3(1): p. 48-60.
23. Mentis, A.A., et al., *Viruses and endogenous retroviruses in multiple sclerosis: From correlation to causation.* Acta Neurol Scand, **2017**. 136(6): p. 606-616.
24. Brettschneider, J., et al., *IgG antibodies against measles, rubella, and varicella zoster virus predict conversion to multiple sclerosis in clinically isolated syndrome.* PLoS One, **2009**. 4(11): p. e7638.
25. Munger, K.L., et al., *Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis.* Jama, **2006**. 296(23): p. 2832-8.
26. Simpson, S., Jr., I.V. der Mei, and B. Taylor, *The Role of Vitamin D in Multiple Sclerosis: Biology and Biochemistry, Epidemiology and Potential Roles in Treatment.* Med Chem, **2018**. 14(2): p. 129-143.

27. Koduah, P., F. Paul, and J.M. Dorr, *Vitamin D in the prevention, prediction and treatment of neurodegenerative and neuroinflammatory diseases*. *Epma j*, **2017**. 8(4): p. 313-325.
28. Gianfrancesco, M.A., et al., *Obesity during childhood and adolescence increases susceptibility to multiple sclerosis after accounting for established genetic and environmental risk factors*. *Obes Res Clin Pract*, **2014**. 8(5): p. e435-47.
29. Riise T, N.M., Ascherio A, *Smoking is a risk factor for multiple sclerosis*. *Neurology*, **2003**. 61(8): p. 1122-1124.
30. Ramanujam R, H.A., Manouchehrinia A, Alfredsson L, Olsson T, Bottai M, Hillert J, *Effect of Smoking Cessation on Multiple Sclerosis Prognosis*. *JAMA Neurology*, **2015**. 72(10): p. 1117-1123.
31. Hedstrom, A.K., et al., *The interaction between smoking and HLA genes in multiple sclerosis: replication and refinement*. *Eur J Epidemiol*, **2017**. 32(10): p. 909-919.
32. Kip, D.m.M., D.r.m.T. Schönfelder, and H.-H. Bleß, *Weißbuch Multiple Sklerose - 2016 Versorgungssituation in Deutschland 2016*: Springer Berlin Heidelberg. 160.
33. Hans-Christoph Diener, C.W., Ralf Gold, *Entzündliche und erregerbedingte Krankheiten: Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose*, in *Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie*, L.d.D.G.f. Neurologie, Editor. 2012, Thieme Verlag Stuttgart: Stuttgart.
34. B Malzkorn, G.R., *Kurzlehrbuch Pathologie, Nervensystem und Sinnesorgane*. **2018**. 13: p. 535-536.
35. Weinshenker, B.G., et al., *The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. I. Clinical course and disability*. *Brain*, **1989**. 112 (Pt 1): p. 133-46.
36. Eriksson M, A.O., Runmarker B, *Long-term follow up of patients with clinically isolated syndromes, relapsing-remitting and secondary progressive multiple sclerosis*. *Multiple Sclerosis Journal*, **2003**. 9: p. 260-274.
37. Koch M, K.E., Rieckmann P, Tremlett H, *The natural history of primary progressive multiple sclerosis*. *Neurology*, **2009**. 73: p. 1996-2002.
38. J. W. Thorpe, D.K., I. F. Moseley, B. E. Kendall, A. J. Thompson, D. G. MacManus, W. I. McDonald and D. H. Miller, *Serial gadolinium-enhanced MRI of the brain and spinal cord in early relapsing-remitting multiple sclerosis*. *Neurology*, **1996**. 46.
39. Thompson AJ, B.B., Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, Correale J, Fazekas F, Filippi M, Freedman MS, Fujihara K, Galetta SL, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Marrie RA, Miller AE, Miller DH, Montalban X, Mowry EM, Sorensen PS, Tintoré

- M, Traboulsee AL, Trojano M, Uitdehaag BMJ, Vukusic S, Waubant E, Weinshenker BG, Reingold SC, Cohen JA, *Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria*. *Lancet Neurology*, **2017**. 17(2): p. 162-173.
40. Neumann, K.F.M.F.M.M., *Multiple Sklerose*. Duale Reihe Neurologie, **2013**. 7: p. 295-303.
 41. Kanchandani R, H.J., *Lhermitte's sign in multiple sclerosis: a clinical survey and review of the literature*. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, **1982**. 45(4): p. 308-312.
 42. Selhorst JB, S.R., *Uhthoff and his symptom*. *Journal of neuro-ophthalmology*, **1995**. 15(2): p. 63-69.
 43. Drulovic J, B.-K.V., Grgic S, Vojinovic S, Dincic E, Toncev G, Kezic MG, Kusic-Tepavcevic D, Dujmovic I, Mesaros S, Miletic-Drakulic S, Pekmezovic T, *The Prevalence of Pain in Adults with Multiple Sclerosis: A Multicenter Cross-Sectional Survey*. *Pain Medicine*, **2015**. 16(8): p. 1597-1602.
 44. Chiaravalloti ND, D.J., *Cognitive impairment in multiple sclerosis*. *The Lancet*, **2008**. 7(12): p. 1139-1151.
 45. Marrie RA, R.N., Cohen J, Trojano M, Sorensen PS, Cutter G, Reingold S, Stuve O, *A systematic review of the incidence and prevalence of sleep disorders and seizure disorders in multiple sclerosis*. *Multiple Sclerosis*, **2015**. 21(3): p. 342-349.
 46. DasGupta R, F.C., *Bladder, bowel and sexual dysfunction in multiple sclerosis: management strategies*. *Drugs*, **2003**. 63(2): p. 153-166.
 47. Dobson R, R.S., Davis A, Giovannoni G, *Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in multiple sclerosis and clinically isolated syndromes: a meta-analysis of prevalence, prognosis and effect of latitude*. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, **2013**. 84(8): p. 909-914.
 48. Felgenhauer K, S.H., Nekic M, Ackermann R., *Cerebrospinal fluid virus antibodies. A diagnostic indicator for multiple sclerosis?* *Journal of the Neurological Sciences*, **1985**. 71: p. 291-299.
 49. Reiber, H. and J.B. Peter, *Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs*. *J Neurol Sci*, **2001**. 184(2): p. 101-22.
 50. Wildemann, S.J.E.F.F.P.A.-D.W., *The MRZ reaction as a highly specific marker of multiple sclerosis: re-evaluation and structured review of the literature*. *Journal of Neurology*, **2017**. 264(3): p. 453-466.
 51. TJ, M., *Diagnosis and treatment of multiple sclerosis*. *BMJ*, **2006**. 332(7540): p. 525.527.

52. Weinschenker BG, O.B.P., Petterson TM, Noseworthy JH, Lucchinetti CF, Dodick DW, Pineda AA, Stevens LN, Rodriguez M, *A randomized trial of plasma exchange in acute central nervous system inflammatory demyelinating disease*. *Annals Neurology*, **1999**. 46(6): p. 878-886.
53. Rivera, V.M., *Multiple Sclerosis: A Global Concern with Multiple Challenges in an Era of Advanced Therapeutic Complex Molecules and Biological Medicines*. *Biomedicines*, **2018**. 6(4).
54. Huhn, K., et al., *No evidence of disease activity status over 3 years in a real-world cohort of relapsing remitting MS patients in Germany*. *Mult Scler Relat Disord*, **2019**. 27: p. 133-138.
55. Hauser SL, B.-O.A., Comi G, Giovannoni G, Hartung HP, Hemmer B, Lublin F, Montalban X, Rammohan KW, Selmaj K, Traboulsee A, Wolinsky JS, Arnold DL, Klingelschmitt G, Masterman D, Fontoura P, Belachew S, Chin P, Mairon N, Garren H, Kappos L; OPERA I and OPERA II Clinical Investigators, *Ocrelizumab versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis*. *New England Journal of Medicine*, **2017**. 376(3): p. 221-234.
56. Montalban X, H.S., Kappos L, Arnold DL, Bar-Or A, Comi G, de Seze J, Giovannoni G, Hartung HP, Hemmer B, Lublin F, Rammohan KW, Selmaj K, Traboulsee A, Sauter A, Masterman D, Fontoura P, Belachew S, Garren H, Mairon N, Chin P, Wolinsky JS1; ORATORIO Clinical Investigators, *Ocrelizumab versus Placebo in Primary Progressive Multiple Sclerosis*. *New England Journal of Medicine*, **2017**. 376(3): p. 209-220.
57. Pittock SJ, M.R., Mayr WT, Jorgensen NW, Weinschenker BG, Noseworthy J, Rodriguez M, *Clinical implications of benign multiple sclerosis: a 20-year population-based follow-up study*. *Annals Neurology*, **2004**. 56: p. 303-306.
58. JF, K., *Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS)*. *Neurology*, **1983**. 33(11): p. 1444-1452.
59. Collins CD, I.B., Bowen JD, Cheng EM, Dobson R, Goodin DS, Lechner-Scott J, Kappos L, Galea I, *A comparative analysis of Patient-Reported Expanded Disability Status Scale tools*. *Multiple Sclerosis*, **2016**. 22(10): p. 1349-1358.
60. BG, W., *Natural history of multiple sclerosis*. *Annals Neurology*, **1994**. 36: p. 6-11.
61. Flachenecker, P., et al., *Multiple sclerosis registry in Germany: results of the extension phase 2005/2006*. *Dtsch Arztebl Int*, **2008**. 105(7): p. 113-9.

62. Scalfari A, K.V., Cutter G, Goodin DS, Ashton R, Ebers GC, *Mortality in patients with multiple sclerosis*. *Neurology*, **2013**. 81(2): p. 184-192.
63. Rodriguez M, S.A., Ward J, Stolp-Smith K, O'Brien P, Kurland L, *Impairment, disability, and handicap in multiple sclerosis: a population-based study in Olmsted County, Minnesota*. *Neurology*, **1994**. 44(1): p. 28-33.
64. Pittock SJ, M.W., McClelland RL, Jorgensen NW, Weigand SD, Noseworthy JH, Weinshenker BG, Rodriguez M, *Change in MS-related disability in a population-based cohort: a 10-year follow-up study*. *Neurology*, **2004**. 62(1): p. 51-59.
65. Johne, R., et al., *Characterization of two novel polyomaviruses of birds by using multiply primed rolling-circle amplification of their genomes*. *J Virol*, **2006**. 80(7): p. 3523-31.
66. Berger, J.R., et al., *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*, **2017**. 74(4): p. 437-444.
67. Wollebo, H.S., et al., *Persistence and pathogenesis of the neurotropic polyomavirus JC*. *Ann Neurol*, **2015**. 77(4): p. 560-70.
68. Gardner SD, F.A., Coleman DV, Hulme B, *New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation*. *The Lancet*, **1971**. 7712: p. 1253-1257.
69. Hirsch HH, R.P.A.I.D.C.o.P., *BK polyomavirus in solid organ transplantation*. *American Journal of transplantation*, **2013**. 13(4): p. 179-188.
70. Arthur RR, S.K., Baust SJ, Santos GW, Saral R., *Association of BK viraemia with hemorrhagic cystitis in recipients of bone marrow transplants*. *New England Journal of Medicine*, **1986**. 315(4): p. 230-234.
71. Padgett BL, W.D., ZuRhein GM, Eckroade RJ, Dessel BH, *Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leukoencephalopathy*. *The Lancet*, **1971**. 7712: p. 1257-1260.
72. Korallnik, I.J., et al., *JC virus granule cell neuronopathy: A novel clinical syndrome distinct from progressive multifocal leukoencephalopathy*. *Ann Neurol*, **2005**. 57(4): p. 576-80.
73. Tobias Allander, K.A., Shawon Gupta, Annelie Bjerker, Gordana Bogdanovic, Mats A. A. Persson, Tina Dalianis, Torbjörn Ramqvist, Björn Andersson, *Identification of a Third Human Polyomavirus*. *Journal of Virology*, **2007**. 81: p. 4130–4136.

74. Anne M Gaynor, M.D.N., David M Whiley, Ian M Mackay, Stephen B Lambert, Guang Wu, Daniel C Brennan, Gregory A Storch, Theo P Sloots, David Wang, *Identification of a Novel Polyomavirus from Patients with Acute Respiratory Tract Infections*. PLOS Pathogens, **2007**. 3.
75. Schowalter RM, P.D., Pumphrey KA, Moyer AL, Buck CB, *Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin*. Cell Host & Microbe, **2010**. 7: p. 509-515.
76. Ho J1, J.J., Feng H, Natalie AA, Grandinetti L, Mirvish E, Crespo MM, Yadav D, Fasanella KE, Proksell S, Kuan SF, Pastrana DV, Buck CB, Shuda Y, Moore PS, Chang Y, *Human polyomavirus 7-associated pruritic rash and viremia in transplant recipients*. The Journal of Infectious Diseases, **2015**. 211: p. 1560-1565.
77. van der Meijden E, J.R., Lauber C, Bouwes Bavinck JN, Gorbalenya AE, Feltkamp MC, *Discovery of a new human polyomavirus associated with trichodysplasia spinulosa in an immunocompromized patient*. PLOS Pathogens, **2010**. 6.
78. Scuda N, H.J., Calvignac-Spencer S, Ruprecht K, Liman P, Kühn J, Hengel H, Ehlers B, *A novel human polyomavirus closely related to the african green monkey-derived lymphotropic polyomavirus*. Journal of Virology, **2011**. 85: p. 4586-4590.
79. Ehlers B, W.U., *The novel human polyomaviruses HPyV6, 7, 9 and beyond*. APMIS, **2013**. 121: p. 783-795.
80. Nischay Mishra, M.P., Roy H. Rhodes, Ping An, James M. Pipas, Komal Jain, Amit Kapoor, Thomas Briese, Phyllis L. Faust, W. Ian Lipkin, *Identification of a Novel Polyomavirus in a Pancreatic Transplant Recipient With Retinal Blindness and Vasculitic Myopathy*. The Journal of Infectious Diseases, **2014**. 210: p. 1595–1599.
81. , E.E., Switzer WM, Heneine W, Viscidi RP, *Serologic evidence for exposure to simian virus 40 in North American zoo workers*. The Journal of Infectious Diseases, **2004**. 190: p. 2065-2069.
82. Fields, B.N., Knipe, David M , Howley, Peter M, *Fields virology / editors-in-chief, David M. Knipe, Peter M. Howley ; associate editors, Jeffrey I. Cohen ... [et al.]*. Vol. 5. **2013**: Philadelphia : Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, c2007.
83. Gosert R, K.P., Major EO, Hirsch HH, *Rearranged JC virus noncoding control regions found in progressive multifocal leukoencephalopathy patient samples increase virus early gene expression and replication rate*. Journal of Virology, **2010**. 84(20): p. 10448-10456.

84. Khalili K, W.M., Sawa H, Nagashima K, Safak M, *The agnoprotein of polyomaviruses: a multifunctional auxiliary protein*. Journal of cellular physiology, **2005**. 204(1): p. 1-7.
85. Unterstab G, G.R., Leuenberger D, Lorentz P, Rinaldo CH, Hirsch HH, *The polyomavirus BK agnoprotein co-localizes with lipid droplets*. Virology, **2010**. 399(2): p. 322-331.
86. Seo GJ, F.L., O'Hara B, Atwood WJ, Sullivan CS, *Evolutionarily conserved function of a viral microRNA*. Journal of Virology, **2008**. 82(20): p. 9823-9828.
87. Hennes EM, K.B., Huppke P, Reindl M, Rostasy K, Berger T, *Age-Dependent Seroprevalence of JCV Antibody in Children*. Neuropediatrics, **2016**. 47(2): p. 112-114.
88. Antonsson A, G.A., Mallitt KA, O'Rourke PK, Pawlita M, Waterboer T, Neale RE, *Prevalence and stability of antibodies to the BK and JC polyomaviruses: a long-term longitudinal study of Australians*. The journal of general virology, **2010**. 91(7): p. 1849-1853.
89. Stolt A, S.K., Koskela P, Lehtinen M, Dillner J, *Seroepidemiology of the human polyomaviruses*. The journal of general virology, **2003**. 84(6): p. 1499-1504.
90. Antonsson A, P.M., Feltkamp MC, Bouwes Bavinck JN, Euvrard S, Harwood CA, Naldi L, Nindl I, Proby CM, Neale RE, Waterboer T, *Longitudinal study of seroprevalence and serostability of the human polyomaviruses JCV and BKV in organ transplant recipients*. Journal of medical neurology, **2013**. 85(2): p. 327-335.
91. Egli A, I.L., Dumoulin A, Buser A, Samaridis J, Stebler C, Gosert R, Hirsch HH., *Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors*. The Journal of Infectious Diseases, **2009**. 199: p. 837-846.
92. Grinnell BW, P.B., Walker DL, *Distribution of nonintegrated DNA from JC papovavirus in organs of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy*. The Journal of Infectious Diseases, **1983**. 147: p. 669-675.
93. Chesters PM, H.J., McCance DJ, *Persistence of DNA sequences of BK virus and JC virus in normal human tissues and in diseased tissues*. The Journal of Infectious Diseases, **1983**. 147: p. 676-684.
94. Bofill-Mas S, P.S., Girones R, *Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage*. Applied and Environmental Microbiology, **2000**. 66: p. 238-245.
95. John A. Vanchiere, S.A., Christina M. Copeland, Lee B. Lu, David Y. Graham, Janet S. Butel, *Polyomavirus Shedding in the*

- Stool of Healthy Adults*. Journal of Clinical Microbiology, **2009**. 47: p. 2388–2391.
96. Bofill-Mas S, F.-C.M., Clemente-Casares P, Calafell F, Girones R., *Potential transmission of human polyomaviruses through the gastrointestinal tract after exposure to virions or viral DNA*. Journal of Virology, **2001**. 75: p. 10290-10299.
 97. Taguchi F, K.J., Miyamura T, *Prevalence rate and age of acquisition of antibodies against JC virus and BK virus in human sera*. Microbiology and Immunology, **1982**. 26: p. 1057-1064.
 98. Engvall, E. and P. Perlmann, *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G*. Immunochemistry, **1971**. 8(9): p. 871-874.
 99. Plavina, T., et al., *Anti-JC virus antibody levels in serum or plasma further define risk of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy*. Ann Neurol, **2014**. 76(6): p. 802-12.
 100. Lee, P., et al., *A second-generation ELISA (STRATIFY JCV DxSelect) for detection of JC virus antibodies in human serum and plasma to support progressive multifocal leukoencephalopathy risk stratification*. J Clin Virol, **2013**. 57(2): p. 141-6.
 101. Berger JR, A.A., Clifford DB, Davis L, Koralnik IJ, Sejvar JJ, Bartt R, Major EO, Nath A., *PML diagnostic criteria: consensus statement from the AAN Neuroinfectious Disease Section*. Neurology, **2013**. 80(15): p. 1430-1438.
 102. Wijburg, M.T., et al., *Concomitant granule cell neuronopathy in patients with natalizumab-associated PML*. Journal of neurology, **2016**. 263(4): p. 649-656.
 103. Holman RC, J.R., Buehler JW, Zelasky MT, Hooper WC, *Epidemiology of progressive multifocal leukoencephalopathy in the United States: analysis of national mortality and AIDS surveillance data*. Neurology, **1991**. 41: p. 1733-1736.
 104. Berger, J.R., et al., *Progressive multifocal leukoencephalopathy in patients with HIV infection*. J Neurovirol, **1998**. 4(1): p. 59-68.
 105. Engsig, F.N., et al., *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, **2009**. 199(1): p. 77-83.
 106. Warnke, C., et al., *[Progressive multifocal leukoencephalopathy]*. Nervenarzt, **2016**. 87(12): p. 1300-1304.
 107. Berger, J.R., *Classifying PML risk with disease modifying therapies*. Mult Scler Relat Disord, **2017**. 12: p. 59-63.
 108. Carson KR, E.A., Richey EA, Habermann TM, Focosi D, Seymour JF, Laubach J, Bawn SD, Gordon LI, Winter JN,

- Furman RR, Vose JM, Zelenetz AD, Mamtani R, Raisch DW, Dorshimer GW, Rosen ST, Muro K, Gottardi-Littell NR, Talley RL, Sartor O, Green D, Major EO, Bennett CL., *Progressive multifocal leukoencephalopathy after rituximab therapy in HIV-negative patients: a report of 57 cases from the Research on Adverse Drug Events and Reports project*. *Blood*, **2009**. 113(20): p. 4834-4840.
109. Korman BD, T.K., Korman NJ., *Progressive multifocal leukoencephalopathy, efalizumab, and immunosuppression: a cautionary tale for dermatologists*. *Archives of dermatology*, **2009**. 145(8).
 110. Blankenbach, K., et al., *Natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy in Germany*. *Neurology*, **2019**. 92(19): p. e2232-e2239.
 111. Astrom, K.E., E.L. Mancall, and E.P. Richardson, Jr., *Progressive multifocal leuko-encephalopathy; a hitherto unrecognized complication of chronic lymphatic leukaemia and Hodgkin's disease*. *Brain*, **1958**. 81(1): p. 93-111.
 112. Arthur, R.R., S. Dagostin, and K.V. Shah, *Detection of BK virus and JC virus in urine and brain tissue by the polymerase chain reaction*. *J Clin Microbiol*, **1989**. 27(6): p. 1174-9.
 113. Yousry TA, P.D., Cadavid D, Gass A, Richert ND, Radue EW, Filippi M., *Magnetic resonance imaging pattern in natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy*. *Annals Neurology*, **2012**. 72(5): p. 779-787.
 114. Whiteman ML, P.M., Berger JR, Tate LG, Bell MD, Limonte LP., *Progressive multifocal leukoencephalopathy in 47 HIV-seropositive patients: neuroimaging with clinical and pathologic correlation*. *Radiology*, **1993**. 187(1): p. 233-240.
 115. Dhanashri P. Miskin, L.H.N., Igor J. Koralnik, *Diagnostic delay in progressive multifocal leukoencephalopathy*. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, **2016**. 5(3): p. 386-391.
 116. Clemens Warnke, M., Gloria von Geldern, MD, Philipp Markwerth,, et al., *Cerebrospinal Fluid JC Virus Antibody Index for Diagnosis of Natalizumab-Associated Progressive Multifocal Leukoencephalopathy*. *Annals of Neurology*, **2014**.
 117. Warnke, C., et al., *Application of the CSF JCV antibody index to early natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **2017**. 88(12): p. 1092-1094.
 118. Albrecht H, H.C., Degen O, Stoehr A, Plettenberg A, Mertenskötter T, Eggers C, Stellbrink HJ., *Highly active antiretroviral therapy significantly improves the prognosis of*

- patients with HIV-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. AIDS, 1998. 12(10): p. 1149-1154.*
119. Cinque P, C.S., Bertelli D, *Progressive multifocal leukoencephalopathy, HIV, and highly active antiretroviral therapy. New England Journal of Medicine, 1998. 339(12): p. 848-849.*
 120. Vulliemoz S, L.-R.F., Borruat FX, Delavelle J, Koralnik IJ, Kuntzer T, Bogousslavsky J, Picard F, Landis T, Du Pasquier RA, *Favourable outcome of progressive multifocal leukoencephalopathy in two patients with dermatomyositis. Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry, 2006. 77(9): p. 1079-1082.*
 121. Crowder CD1, G.K., Drachenberg CB, Werner J, Morales RE, Hirsch HH, Ramos E., *Successful outcome of progressive multifocal leukoencephalopathy in a renal transplant patient. American Journal of transplantation 2005. 5(5): p. 1151-1158.*
 122. Clifford DB, D.L.A., Simpson DM, Arendt G, Giovannoni G, Nath A., *Natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy in patients with multiple sclerosis: lessons from 28 cases. The Lancet. Neurology, 2010. 9(4): p. 438-446.*
 123. Vermersch P, K.L., Gold R, Foley JF, Olsson T, Cadavid D, Bozic C, Richman S., *Clinical outcomes of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. Neurology, 2011. 76(20): p. 1697-1704.*
 124. Hou J, M.E., *The efficacy of nucleoside analogs against JC virus multiplication in a persistently infected human fetal brain cell line. Journal of neurovirology, 1998. 4(4): p. 451-456.*
 125. Brickelmaier M, L.A., Kartikeyan R, Reviriego-Mendoza MM, Allaire N, Simon K, Frisque RJ, Gorelik L., *Identification and characterization of mefloquine efficacy against JC virus in vitro. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2009. 53(5): p. 1840-1849.*
 126. Elphick GF, Q.W., Jordan JA, Gee GV, Eash S, Manley K, Dugan A, Stanifer M, Bhatnagar A, Kroeze WK, Roth BL, Atwood WJ, *The human polyomavirus, JCV, uses serotonin receptors to infect cells. Science, 2004. 5700(306): p. 1380-1383.*
 127. Cortese, I., et al., *Pembrolizumab Treatment for Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. N Engl J Med, 2019. 380(17): p. 1597-1605.*
 128. B Malzkorn, G.R., *Kurzlehrbuch Pathologie, Kaptiel Nerensystem und Sinnesorgane. 2018: Elsevier.*
 129. Tan IL, M.J., Clifford DB, Major EO, Nath A., *Immune reconstitution inflammatory syndrome in natalizumab-associated PML. Neurology, 2011. 77(11): p. 1061-1067.*

130. Tan K, R.R., Ostrow L, McArthur J, Nath A, *PML-IRIS in patients with HIV infection: clinical manifestations and treatment with steroids*. *Neurology*, **2009**. 72(17): p. 1458-1464.
131. Martinez JV1, M.J., Efron ED, Bonardo P, Jordan R, Sevlever G, Martinez M, Verbanaz SC, Salazar ZS, Pardal MF, Reisin R., *Immune reconstitution inflammatory syndrome associated with PML in AIDS: a treatable disorder*. *Neurology*, **2011**. 67(9).
132. Giacomini, P.S., et al., *Maraviroc and JC virus-associated immune reconstitution inflammatory syndrome*. *N Engl J Med*, **2014**. 370(5): p. 486-8.
133. Khanna, N., et al., *Incidence and outcome of progressive multifocal leukoencephalopathy over 20 years of the Swiss HIV Cohort Study*. *Clin Infect Dis*, **2009**. 48(10): p. 1459-66.
134. Engsig FN, H.A., Omland LH, Kronborg G, Gerstoft J, Laursen AL, Pedersen C, Mogensen CB, Nielsen L, Obel N., *Incidence, clinical presentation, and outcome of progressive multifocal leukoencephalopathy in HIV-infected patients during the highly active antiretroviral therapy era: a nationwide cohort study*. *Journal of infectious diseases*, **2009**. 199(1): p. 77-83.
135. Antinori A, C.A., Lorenzini P, Giancola ML, Uccella I, Bossolasco S, Grisetti S, Moretti F, Vigo B, Bongiovanni M, Del Grosso B, Arcidiacono MI, Fibbia GC, Mena M, Finazzi MG, Guaraldi G, Ammassari A, d'Arminio Monforte A, Cinque P, De Luca A; Italian Registry Investigative Neuro AIDS Study Group, *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)*. *Journal of neurovirology*, **2003**. 9: p. 47-53.
136. Wyen C, H.C., Schmeisser N, Wöhrmann A, Qurishi N, Rockstroh J, Esser S, Rieke A, Ross B, Lorenzen T, Schmitz K, Stenzel W, Salzberger B, Fätkenheuer G., *Progressive multifocal leukoencephalopathy in patients on highly active antiretroviral therapy: survival and risk factors of death*. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*, **2014**. 37(2): p. 1263-1268.
137. L, K., *Natalizumab-associated PML survival rates exceed 80%, in ECTRIMS/ACTRIMS 5th joint triennial congress*. 2011: Amsterdam.
138. Dahlhaus S, H.R., Chan A, Kleiter I, Adams O, Lukas C, Hellwig K, Gold R, *Disease course and outcome of 15 monocentrically treated natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy patients*. *Journal of neurology, neurosurgery and psychiatry*, **2013**. 84(10): p. 1068-1074.

139. Dong-Si, T., et al., *Outcome and survival of asymptomatic PML in natalizumab-treated MS patients*. *Ann Clin Transl Neurol*, **2014**. 1(10): p. 755-64.
140. Léger OJ, Y.T., Tanner L, Horner HC, Hines DK, Keen S, Saldanha J, Jones ST, Fritz LC, Bendig MM, *Humanization of a mouse antibody against human alpha-4 integrin: a potential therapeutic for the treatment of multiple sclerosis*. *Hum Antibodies*, **1997**: p. 3-16.
141. Yednock, T.A., et al., *Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin*. *Nature*, **1992**. 356(6364): p. 63-6.
142. Adelman B, S.A., Panzara MA, *Natalizumab and Progressive Multifocal Leukoencephalopathy*. *New England Journal of Medicine*, **2005**. 353: p. 432-433.
143. Chris H. Polman, M.D., Paul W. O'Connor, M.D., Eva Havrdova, M.D., Michael Hutchinson, M.D., Ludwig Kappos, M.D., David H. Miller, M.D., J. Theodore Phillips, M.D., Ph.D., Fred D. Lublin, M.D., Gavin Giovannoni, M.D., Andrzej Wajgt, M.D., Martin Toal, M.B., M.F.P.M., Frances Lynn, M.Sc., *A Randomized, Placebo-Controlled Trial of Natalizumab for Relapsing Multiple Sclerosis*. *New England Journal of Medicine*. 354: p. 899-910.
144. Incorporated, B., *Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels Natalizumab*. **2016**: p. 40.
145. Schwab N, S.-H.T., Melzer N, Cutter G, Wiendl H, *Natalizumab-associated PML: Challenges with incidence, resulting risk, and risk stratification*. *Neurology*, **2017**. 88: p. 1197-1205.
146. Incorporated, B., *Arzt Information und Management Leitlinien für Multiple Sklerose-Patienten, die TYSABRI® erhalten*. **2017**. 17: p. 28.
147. Deutsche Multiple Sklerose Gesellschaft (DMSG), B.e.V. and K.K.M.S.K.e. V., *PML Risikoabschätzung, in Natalizumab Tysabri Informationen für Patienten*. 2019, Geschäftsstelle des KKNMS, DMSG-Bundesverband. p. 16-21.
148. Perez-Liz, G., et al., *Detection of JC virus DNA fragments but not proteins in normal brain tissue*. *Ann Neurol*, **2008**. 64(4): p. 379-87.
149. Stuve, O., et al., *Altered CD4+/CD8+ T-cell ratios in cerebrospinal fluid of natalizumab-treated patients with multiple sclerosis*. *Arch Neurol*, **2006**. 63(10): p. 1383-7.
150. Lin, J., et al., *Cerebrospinal fluid and serum JC virus antibody detection in multiple sclerosis patients treated with natalizumab*. *J Neuroimmunol*, **2013**. 261(1-2): p. 123-8.

151. Rudick, R.A., et al., *Assessment of JC virus DNA in blood and urine from natalizumab-treated patients*. *Ann Neurol*, **2010**. 68(3): p. 304-10.
152. Tornatore, C., et al., *Detection of JC virus DNA in peripheral lymphocytes from patients with and without progressive multifocal leukoencephalopathy*. *Ann Neurol*, **1992**. 31(4): p. 454-62.
153. E, H., *Biological and clinical aspects of ABO blood group system*. *The Journal of medical investigation*, **2008**. 55(3-4): p. 174-183.
154. Müller, M.M.G., C; Zacharowski, K; Tonn, T; Seifried, E, *Transfusion of Packed Red Cells Indications, Triggers and Adverse Events*. *Deutsches Ärzteblatt*, **2015**. 112(29): p. 507-518.
155. Fagerberg L, H.B., Oksvold P, Kampf C, Djureinovic D, Odeberg J, Habuka M, Tahmasebpoor S, Danielsson A, Edlund K, Asplund A, Sjöstedt E, Lundberg E, Szigartyo CA, Skogs M, Takanen JO, Berling H, Tegel H, Mulder J, Nilsson P, Schwenk JM, Lindskog C, Danielsson F, Mardinoglu A, Sivertsson A, von Feilitzen K, Forsberg M, Zwahlen M, Olsson I, Navani S, Huss M, Nielsen J, Ponten F, Uhlén M, *Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics*. *molecular and cellular proteomics*, **2014**. 13(2): p. 397-406.
156. White, M.K., et al., *Diagnostic assays for polyomavirus JC and progressive multifocal leukoencephalopathy*. *Reviews in medical virology*, **2016**. 26(2): p. 102-114.
157. Michael N. Khoury, M.D., Murray A. Mittleman, M.D , and Igor J. Koralnik, M.D., *ABO Blood Groups and Risk of Progressive Multifocal Leukoencephalopathy*. *JAMA Neurology*, **2013**. 70(10): p. 1331-1332.
158. Sundqvist, E., et al., *JC polyomavirus infection is strongly controlled by human leucocyte antigen class II variants*. *PLoS Pathog*, **2014**. 10(4): p. e1004084.
159. Jesse Huang, I.L.B., Angelika Michel, Jenny Link, Mohsen Khademi, Clemens Warnke, Jan Hillert, Lars Alfredsson, Tim Waterboer, Tomas Olsson, Ingrid Kockum, *ABO blood groups and secretion status is associated with JC polyomavirus antibody levels in plasma: a genome-wide association study*, in *ECTRIMS*. 2017: Paris. p. 1.
160. Dumoulin, A. and H.H. Hirsch, *Reevaluating and optimizing polyomavirus BK and JC real-time PCR assays to detect rare sequence polymorphisms*. *J Clin Microbiol*, **2011**. 49(4): p. 1382-8.

161. Warnke, C., et al., *An assay to quantify species-specific anti-JC virus antibody levels in MS patients*. *Mult Scler*, **2013**. 19(9): p. 1137-44.
162. Hutchinson, M., *Natalizumab: A new treatment for relapsing remitting multiple sclerosis*. *Therapeutics and clinical risk management*, **2007**. 3(2): p. 259-268.
163. Cooling, L., *Blood Groups in Infection and Host Susceptibility*. *Clin Microbiol Rev*, **2015**. 28(3): p. 801-70.
164. Mandal, P.K., et al., *Towards a structural basis for the relationship between blood group and the severity of El Tor cholera*. *Angew Chem Int Ed Engl*, **2012**. 51(21): p. 5143-6.
165. Rossez, Y., et al., *Almost all human gastric mucin O-glycans harbor blood group A, B or H antigens and are potential binding sites for Helicobacter pylori*. *Glycobiology*, **2012**. 22(9): p. 1193-206.
166. Martins, L.C., et al., *ABH and Lewis antigen distributions in blood, saliva and gastric mucosa and H pylori infection in gastric ulcer patients*. *World J Gastroenterol*, **2006**. 12(7): p. 1120-4.
167. de Mattos, L.C., et al., *ABO, Lewis, secretor and non-secretor phenotypes in patients infected or uninfected by the Helicobacter pylori bacillus*. *Sao Paulo Med J*, **2002**. 120(2): p. 55-8.
168. Hutson, A.M., et al., *Norwalk virus-like particle hemagglutination by binding to h histo-blood group antigens*. *J Virol*, **2003**. 77(1): p. 405-15.
169. Hutson, A.M., et al., *Norwalk virus infection and disease is associated with ABO histo-blood group type*. *J Infect Dis*, **2002**. 185(9): p. 1335-7.
170. Kreuz, D.R. *Blutgruppen und Verteilung in der Bevölkerung*. 2018; Available from: <https://www.drk-blutspende.de/spenderservices/blutgruppen-und-verteilung-in-der-bevoelkerung.php>.
171. Rumbwere Dube, B.N., T.P. Marshall, and R.P. Ryan, *Predictors of human immunodeficiency virus (HIV) infection in primary care: a systematic review protocol*. *Systematic reviews*, **2016**. 5(1): p. 158-158.
172. Ghirelli, C. and T. Hagemann, *Targeting immunosuppression for cancer therapy*. *The Journal of Clinical Investigation*, **2013**. 123(6): p. 2355-2357.
173. von Andrian, U.H. and B. Engelhardt, *Alpha4 integrins as therapeutic targets in autoimmune disease*. *N Engl J Med*, **2003**. 348(1): p. 68-72.
174. Prosperini, L., et al., *Age as a risk factor for early onset of natalizumab-related progressive multifocal leukoencephalopathy*. *J Neurovirol*, **2017**. 23(5): p. 742-749.

175. Mills, E.A. and Y. Mao-Draayer, *Aging and lymphocyte changes by immunomodulatory therapies impact PML risk in multiple sclerosis patients*. *Mult Scler*, **2018**. 24(8): p. 1014-1022.
176. Nambiar, R.K., et al., *Blood group change in acute myeloid leukemia*. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*, **2017**. 30(1): p. 74-75.
177. Gorelik, L., et al., *Anti-JC virus antibodies: implications for PML risk stratification*. *Ann Neurol*, **2010**. 68(3): p. 295-303.
178. Taylor, S.L., et al., *Infection's Sweet Tooth: How Glycans Mediate Infection and Disease Susceptibility*. *Trends Microbiol*, **2018**. 26(2): p. 92-101.
179. Clarke, C.A., et al., *Secretion of blood group antigens and peptic ulcer*. *Br Med J*, **1959**. 1(5122): p. 603-7.
180. Clarke, C.A., et al., *ABO blood groups and secretor character in duodenal ulcer; population and sibship studies*. *Br Med J*, **1956**. 2(4995): p. 725-31.
181. Ansari, S.A., et al., *Correlation of ABH blood group antigens secretion with Helicobacter pylori infection in Pakistani patients*. *Trop Med Int Health*, **2015**. 20(1): p. 115-9.
182. Frisque, R.J., G.L. Bream, and M.T. Cannella, *Human polyomavirus JC virus genome*. *J Virol*, **1984**. 51(2): p. 458-69.
183. Low, J.A., et al., *Identification of gangliosides GD1b and GT1b as receptors for BK virus*. *J Virol*, **2006**. 80(3): p. 1361-6.
184. Pia Frenken, H.-P.H., Tomas Olsson, O. Adams, C. Warnke, *Type O blood group associates with higher anti-JCPyV antibody levels*, in *33rd Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS)*. 2017: Paris. p. 1.
185. Samorei, I.W., et al., *High sensitivity detection of JC-virus DNA in postmortem brain tissue by in situ PCR*. *J Neurovirol*, **2000**. 6(1): p. 61-74.
186. Wijburg, M.T., et al., *Association of Progressive Multifocal Leukoencephalopathy Lesion Volume With JC Virus Polymerase Chain Reaction Results in Cerebrospinal Fluid of Natalizumab-Treated Patients With Multiple Sclerosis*. *JAMA Neurol*, **2018**. 75(7): p. 827-833.
187. Bloomgren, G., et al., *Risk of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy*. *N Engl J Med*, **2012**. 366(20): p. 1870-80.
188. Plavina, T., et al., *Anti-JC virus antibody levels in serum or plasma further define risk of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy*. *Annals of neurology*, **2014**. 76(6): p. 802-812.

189. Warnke, C., et al., *Changes to anti-JCV antibody levels in a Swedish national MS cohort*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, **2013**. 84(11): p. 1199-205.
190. Daneman, R. and A. Prat, *The blood-brain barrier*. Cold Spring Harb Perspect Biol, **2015**. 7(1): p. a020412.

Danksagung

Allen voran möchte ich meinen Betreuern Prof. Dr. med. Ortwin Adams und PD Dr. med. Clemens Warnke für Ihre Unterstützung, Geduld und konstruktive Kritik danken.

Dem Personal der Blutbank danke ich für die freundliche Einweisung in die Geräte und Abläufe, die zur Bestimmung der Blutgruppen nötig waren.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, ohne deren Unterstützung diese Arbeit ebenfalls nicht möglich gewesen wäre. Auch in schwierigen Situationen habe ich immer ein offenes Ohr, aufmunternde Worte und Motivation gefunden.

Meinen Freunden möchte ich für, Hilfen, Tipps und Korrekturen danken, welche den

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinem Freund bedanken, welcher mir in der ganzen Zeit ebenfalls eine starke Stütze war, mich in vielen Situationen motivieren konnte, wenn ich es selbst nicht konnte und mir technischen Fragen so oft zur Seite gestanden hat.