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

Molekulare und funktionale Analyse der nicht-kodierenden Kontrollregion (NCCR) des humanen Polyomavirus JC bei Patienten mit einer progressiven multifokalen Leukenzephalopathie (PML)

Dissertation

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

> vorgelegt von Cornelia Regina Schmitz 2023

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

gez.: Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker Erstgutachter: Prof. Dr. med. Ortwin Adams Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Orhan Aktas

Zusammenfassung (Deutsch)

Das John-Cunningham-Virus (JCV) gehört zur Gruppe der humanen Polyomaviren und ist ein kleines, unbehülltes Virus mit zirkulärer, doppelsträngiger DNA. Der Erstkontakt mit dem JCV-Ursprungstyp ("Archetyp") ereignet sich in der Regel im frühen Jugendalter und die weltweite Durchseuchungsrate liegt bei ca. 40%-60%. Dieser Archetyp persistiert lebenslang vorzugsweise im Urogenitaltrakt, im Knochenmark, in Lymphozyten und potenziell auch im ZNS. Unter Immunsuppression des Wirts (z.B. HIV-Infektion, immunsuppressive Therapie mit monoklonalen Antikörpern) ist das reaktivierte JC-Virus Verursacher der progressiven multifokalen Leukenzephalopathie (PML), einer lebensbedrohlichen, neurologischen Erkrankung. Voraussetzung für die Entstehung der PML scheint die Veränderung in einer Genregion des Virus zu sein, der *Non-coding control region* (NCCR), einer nicht kodierenden Region, die kontrollierend auf die Transkription angrenzender Proteine der frühen und späten Genexpression wirkt. Diese Veränderung der NCCR-Archetypsequenz hin zur "PML-Typ-NCCR-Sequenz" ist gekennzeichnet durch hochkomplexe *Rearrangements*, Deletionen und Insertionen der 6 Sequenzblöcke a-f, die in der NCCR definiert sind.

Diese Arbeit soll Erkenntnisse über die verschiedenen Veränderungen und Mutationen in der NCCR geben sowie über das Vorhandensein von Minorvarianten. Die Majorvarianten/Consensussequenzen der JCV-NCCR-Sequenzen wurden mittels Sangersequenzierung und Minorvarianten durch Tiefensequenzierung bestimmt. Die dabei gefundenen Mutationen wurden funktionell hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die Promotoraktivität und Replikationsfähigkeit untersucht. Dies geschieht in einem bidirektionalen Reporterplasmid, bei dem die Expression der Fluorophore als Korrelat für die frühe bzw. späte Promotoraktivität mittels Durchflusszytometrie gemessen wird. Die Sequenzanalyse der Mutationen in den zeitgleich entnommenen Serum- und Liquorproben soll Aufschluss darüber geben, ob die Verteilung von distinkten Minor- und Majorvarianten in der Peripherie und im Liquorraum Regeln unterliegt oder individuell unterschiedlich ist. Dies könnte Hinweise darauf geben wo, anatomisch gesehen, und wie der Switch vom Archetyp zum neurovirulenten PML-Typ stattfindet.

Für diese Untersuchung wurden insgesamt 26 JCV-DNA positive Proben (13 Liquor- und 13 Serum-proben) analysiert – darunter 10 Liguor- und Serumprobenpaare von 10 PML-Patienten. 25 der 26 untersuchten JCV-NCCR-Sequenzen zeigten Veränderungen im Vergleich zum Archetyp, eine Probe wies exakt die Archetypsequenz auf. Häufige Veränderungen (Rearrangements, Deletionen, Insertionen, Duplikationen, Einzelnukleotidveränderungen/Punktmutationen) zeigten sich in den Sequenzblöcken c, d und e. Es konnte kein einheitliches Bild beim Vergleich der patientenindividuellen Liquor-NCCR-Consensussequenz mit der jeweiligen Serum-Consensussequenz festgestellt werden; bei 3 der 10 Probenpaare war die Consensussequenz in Liquor und Serum unterschiedlich, bei 7 hingegen war sie identisch. In 23 der 26 Patientenproben konnten Minorvarianten detektiert werden, die entweder nur vereinzelte Punktmutationen/ Einzelnukleotidveränderungen im Vergleich zur zugehörigen Majorvariante aufwiesen oder Varianten mit größeren Veränderungen und Rearrangements im Vergleich zur dominierenden Consensussequenz zeigten. Auch hier ergab sich kein einheitliches Bild bzgl. der Verteilung von Minorvarianten in Liquor- und korrespondierender Serumprobe. 24 der 26 Proben zeigten eine signifikante Steigerung der frühen Promotoraktivität im Vergleich zum Archetypniveau, bei der späten Promotoraktivität konnte sowohl eine signifikante Steigerung als auch eine signifikante Abnahme im Vergleich zum Archetyp beobachtet werden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass es eine starke Assoziation zwischen einer veränderten NCCR und der Manifestation der PML gibt. Das nicht einheitliche Verteilungsmuster der Consensus-sequenzen in Liquor und Serum deutet daraufhin, dass der Krankheitsprozess nicht bei allen PML-Patienten gleich ist. Das Vorkommen unterschiedlicher Minorvarianten in Liquor und Serum spricht für einen unabhängigen in beiden Kompartimenten vorkommenden Selektionsprozess. Die PML-spezifischen Mutationen in der NCCR führen zu einer Zunahme der frühen Promotoraktivität, wodurch letztendlich die Replikationsfähigkeit und Virulenz des Virus gesteigert wird. Die Ergebnisse geben sowohl Hinweise für eine hämatogene virale Route (NCCR-Varianten entstehen in der Peripherie und wandern dann ins ZNS) als auch für einen Prozess, in dem das JCV im ZNS ruht und vor Ort Veränderungen im Rahmen der Reaktivierung unterläuft. Beide Hypothesen sind denkbar und es könnte zwei unterschiedliche Pathomechanismen und virale Routen bei PML-Patienten geben.

Zusammenfassung (Englisch)

John Cunningham virus (JCV) belongs to the human polyomavirus group and is a small, non-enveloped virus with circular, double-stranded DNA. Initial contact with the JCV original type ("archetype") usually occurs in early adolescence and the global rate of infection is approximately 40%-60%. This archetype persists throughout life, preferentially in the genitourinary tract, bone marrow, lymphocytes, and potentially the CNS. Under host immunosuppression (e.g., HIV infection, immunosuppressive therapy with monoclonal antibodies), reactivated JC virus is the causative agent of progressive multifocal leukoencephalopathy (PML), a life-threatening neurological disease. A prerequisite for the development of PML appears to be an alteration in a gene region of the virus, the noncoding control region (NCCR), a noncoding region that has a controlling effect on the transcription of adjacent proteins of early and late gene expression. This change in the NCCR archetype sequence to the "PML-type NCCR sequence" is characterized by highly complex rearrangements, deletions, and insertions of the 6 sequence blocks a-f defined in the NCCR.

This work aims to provide insights into the various alterations and mutations in the NCCR, as well as the presence of minor variants. The major variants/consensus sequences of the JCV-NCCR sequences were determined by sanger sequencing and minor variants by deep sequencing. The mutations found were functionally analyzed for their effects on promoter activity and replication capacity. This is done in a bidirectional reporter plasmid in which the expression of fluorophores is measured as a correlate for early or late promoter activity by flow cytometry. Sequence analysis of mutations in serum and CSF samples collected at the same time will provide information on whether the distribution of distinct minor and major variants in the periphery and CSF space is subject to rules or varies between individuals. This could provide clues as to where, anatomically, and how the switch from archetype to neurovirulent PML type occurs.

For this study, a total of 26 JCV DNA positive samples (13 CSF and 13 serum samples) were analyzed-including 10 CSF and serum sample pairs from 10 PML patients. Twenty-five of the 26 JCV-NCCR sequences examined showed alterations compared with the archetype, and one sample had the exact archetype sequence. Frequent changes (rearrangements, deletions, insertions, duplications, single nucleotide changes/point mutations) were seen in sequence blocks c, d, and e. No consistent picture could be found when comparing the patient-specific CSF NCCR consensus sequence with the respective serum consensus sequence; in 3 of the 10 pairs of samples, the consensus sequence was different in CSF and serum, whereas in 7 it was identical. In 23 of the 26 patient samples, minor variants could be detected, which either showed only isolated point mutations/single nucleotide changes and rearrangements compared to the dominant consensus sequence. Again, there was no uniform picture regarding the distribution of minor variants in CSF and corresponding serum samples. 24 of the 26 samples showed a significant increase in early promoter activity compared to the archetype level, and in late promoter activity both a significant increase and a significant decrease could be observed compared to the archetype.

In conclusion, there is a strong association between altered NCCR and manifestation of PML. The nonuniform distribution pattern of consensus sequences in CSF and serum suggests that the disease process is not the same in all PML patients. The presence of different minor variants in CSF and serum suggests an independent selection process occurring in both compartments. The PML-specific mutations in NCCR lead to an increase in early promoter activity, ultimately increasing the replicative capacity and virulence of the virus. The results provide evidence for both a hematogenous viral route (NCCR variants arise in peri-phery and then migrate to the CNS) and a process in which JCV is dormant in the CNS and undergoes on-site changes as part of reactivation. Both hypotheses are conceivable and there could be two distinct pathomechanisms and viral routes in PML patients.

Abkürzungsverzeichnis

#1-10	Patientennummer	HIV	human immunodeficiency virus
A	Adenin	IRIS	immune reconstitution
AIDS	Acquired immunodeficiency		inflammatory syndrome
	syndrome	JCV	John-Cunningham-Virus
AML	Akute myeloische Leukämie	JCVE	JCV-Enzephalopathie
Вр	Basenpaare	LB	Lysogeny broth bzw. Luria-
с	Cytosin		Bertani-Medium
CLL	Chronische lympathische	LSTc	Lactoseries tetrasaccharide c
	Leukämie	MuPyV	Maus-Polyomavirus
CSF	Cerebrospinal fluid	MRT	Magnetresonanztomographie
СТ	Computertomographie	MS	Multiple Sklerose
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-	NCCR	Non Coding Control Region bzw.
	associated protein 4		Nicht-kodierende Kontrollregion
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-	NGS	Next-Generation-Sequencing
	Triphosphate	ORI	Origin of replication
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle	PCR	Polymerase chain reaction
	Medium	PD-L-1	Programmed death ligand 1
DNA	Deoxyribonucleic acid	PD-1	Programmed cell death protein 1
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat	PML	Progressive multifokale
DPBS	Dulbecco´s Phosphate Buffered		Leukenzephalopathie
	Saline	PP2A	Proteinphosphatase 2A
E. coli	Escherichia coli	Rb	Retinoblastoma
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	RNA	Ribonucleic acid
eGFP	Enhanced green fluorescent	Rpm	Revolutions per minute
	protein	S	Serum
FACS	Fluorescence-activated cell	SBS	Sequencing by Synthesis
	sorting	SLE	Systemischer Lupus
FBS	Fetal Bovine Serum		erythematodes
FSC	Forward scatter	SSC	Side scatter
G	Guanin	т	Thymin
H ₂ O	Wasser	VP	Viral Protein
HAART	highly active antiretroviral	ZNS	Zentrales Nervensystem
	therapy		

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung		1
	1.1 Das Jo	C-Virus	1
	1.1.1 Ta	xonomische Einordnung	1
	1.1.2 Au	fbau und genomische Struktur	2
	1.1.3 Inf	ektionsweg und Krankheitswert	4
	1.1.4 Ge	schichte	6
	1.2 Proar	essive multifokale Leukenzephalopathie	8
	1.2.1 Pa	ientenkollektiv	8
	1.2.2 Kli	nik und Diagnostik	9
	1.2.3 Th	erapie und Prognose	11
	1.3 Mit d	er PML assoziierte Mutationen im Virus	
	1.3.1 Ni	ht-kodierende Kontrollregion (NCCR)	13
	1.3.2 VF	1	16
	1.4 Ziele	der Arbeit	16
2	Material u	nd Methoden	
	21 Basch	reihung des Patientenkollektivs /Art und Menge der Prohen	18
	2.2 Probe	ngewinnung	20
	2.3 Mater	ial	20
	2.3.1 Ge	räte	20
	2.3.2 Ve	rbrauchsmaterialien	22
	2.3.2.1	Primer	22
	2.3.2.2	Enzyme	22
	2.3.2.3	Medien	23
	2.3.2.4	Zellkulturmedien	23
	2.3.3 Klo	nierungsplasmid	23
	2.3.4 Ze	llinien	24
	2.4 Meth	oden	24
	2.4.1 Erl	lärung des Versuchsaufbaus	24
	2.4.2 Ne	sted-PCR	25
	2.4.3 Klo	nierungsablauf	28
	2.4.3.1	Restriktionsverdau	28
	2.4.3.2	Ligation der NCCR mit dem Klonierungsplasmid	29
	2.4.3.3	Transfektion des Ligationsansatzes in kompetente E.coli	29
	2.4.3.4	Animpfen der gewachsenen Kolonien	
	2.4.3.5	Analytische Plasmid-DNA-Aufreinigung und Restriktionsverdau	
	2.4.3.6	Präparative Plasmid-DNA-Aufreinigung	31
	2.4.3.7	Transfektion des Klonierungsplasmids in HEK293T-Zellen	
	2.4.4 Du	rchflusszytometrische Auswertung	33
	2.4.4.1	Ablauf der Durchflusszytometrie	33
	2.4.4.2	Präparation der HEK293T-Zellen für die durchflusszytometrische Auswertung	34
	2.4.4.3	Kompensation und Gating für die durchflusszytometrische Auswertung	35
	2.4.5 Sa	nger-Sequenzierung	
	2.4.5.1	Ablaut der Sangersequenzierung	
	2.4.5.2	Sequenzierung über kommerziellen Anbieter	
	2.4.5.3	Ergebnisübermittlung	40
	2.4.6 Tie	ntensequenzierung	
	2.4.6.1	Ablaut der Tietensequenzierung	40

	2	.4.6.2	Sequenzierung über kommerziellen Anbieter	
	2	.4.6.3	Ergebnisubermittlung	
	2.5	Statisti	sche Auswertung sowie verwendete Programme	
	2.6	Ethikvo	tum	
3	Erge	ebnisse		43
	3.1	Sanger	sequenzen der Liquor- und Serumproben in Bezug auf Archetyp	
	3.1.	1 Hint	ergrund der Untersuchung	43
	3.1.	2 Vers	schiedene Sequenzen in Liquor und Serum bei einem Patientenprobenpaar	45
	3.1.	3 Iden	tische Sequenzen in Liquor und Serum bei einem Patientenprobenpaar	47
	3.1.	4 Einz	elsequenzen	
	3.1.	5 Erlä	uterung und Vergleich der gefundenen Consensussequenzen	53
	3.1.	6 Zusa	ammenfassung der Analyse mittels Sangersequenzierung	54
	3.2	Tiefens	equenzierung der Liquor- und Serumproben	56
	3.2.	1 Hint	ergrund der Untersuchung	56
	3.2.	2 Eint	eilung und Anzahl der gefundenen Minorvarianten	56
	3.2.	3 Besc	hreibung der gefundenen Varianten im Vergleich zur Consensussequenz	58
	3.2.	4 Geg	enüberstellung der im Liquor bzw. im Serum gefundenen Minor-Varianten	77
	3.2.	5 Zusa	ammenfassung der Analyse der Tiefensequenzierung	79
	3.3	Durchf	lusszytometrische Auswertung	81
	3.3.	1 Hint	ergrund der Untersuchung	
	3.3.	2 Früł	ne und späte Promotoraktivität pro Patientenprobe	
	3.3.	3 Früł	ne und späte Promotoraktivität im Liquor-Serum-Vergleich	86
	3.3.	4 Korr	elationsanalysen	
	3	.3.4.1	Zielgröße "Promotoraktivität"	
	3	.3.4.2	Zielgröße "Viruslast"	90
	3.3.	5 Zusa	ammenfassung der durchflusszytometrischen Analysen	92
4	Disk	cussion		94
	4.1	NCCR-S	Sangersequenzierung	
	4.2	NCCR-T	Fiefensequenzierung	
	4.3	Messur	g der Genexpression mittels FACS-Analyse	100
	4.4	Zusami	nenfassende Bewertung	102
5	Lite	ratur un	d Quellenverzeichnis	

1 Einleitung

1.1 Das JC-Virus

1.1.1 Taxonomische Einordnung

Das JC-Virus (John-Cunningham-Virus) ist neben dem BK-Virus einer der bekanntesten Vertreter der Familie der humanen Polyomaviren. Der Name des Virus, "JC", lässt sich von den Initialen des Patienten John Cunningham ableiten, bei dem das Virus 1971 erstmalig isoliert wurde [1]. Weiterhin ist das JC-Virus auch unter den Namen "Humanes Polyomavirus 2" bzw. "Humanes JC Polyomavirus JCPyV" bekannt.

Die Familie der Polyomaviren umfasst eine Gruppe kleiner, nicht behüllter Viren mit zirkulärer, doppelsträngiger DNA (*Deoxyribonucleic acid*). Früher wurden die Polyomaviren mit den Papillomaviren zu der Familie "Papovaviren" zusammengefasst (das Wort "*Papovaviridae*" bzw. Papovaviren stellt ein Akronym aus den Worten **Pa**pilloma-, **Po**lyoma- und Simian **Va**coulating Virus 40 dar) [2, 3]. Im Jahr 1999 wurde diese Familie in zwei separate Virusfamilien, die Papilloma- und die Polyomaviren, aufgeteilt, ehe diese 2019 unter der Klasse *Papovaviricites* wieder zusammengeführt wurden [4].

In der Familie der Polyomaviren wurden bislang 102 verschiedene Spezies entdeckt und isoliert (Zahl stetig wachsend), die wiederum nach der Studiengruppe *Polyomaviridae* des *International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)* in 4 verschiedene Gattungen bzw. Genera eingeteilt werden können: *Alphapolyomavirus, Betapolyomavirus, Gammapolyomavirus* und *Deltapolyomavirus* [5, 6]. Polyomaviren können verschiedene Arten von Säugetieren (u.a. Menschen, Affen, Delphine, Fledermäuse), Vögel und Fische infizieren [5, 6]. Lediglich 13 dieser 73 Spezies sind humane Polyomaviren (kommen also im Menschen vor) - hierzu zählen neben dem JC-Virus und dem BK-Virus u.a. das Merkelzell-Polyomavirus, KI-Polyomaviren lassen sich den Gattungen *Alphapolyomavirus, Betapolyomavirus* zuordnen. Sowohl das JC-, als auch das BK-Virus gehören zur Gattung der *Betapolyomaviridae*, zu der insgesamt 26 verschiedene Polyomaviren gehören und deren typische Leitspezies das *Macaca mulatta polyomavirus 1* ist, besser bekannt als Simian-Virus-40 (SV40) [5].

Lediglich 4 der 13 humanen Polyomaviren lösen nach aktuellem Wissensstand im Menschen eine Erkrankung aus bzw. sind mit einer Krankheit assoziiert: das JC-Virus, das BK-Virus (humanes Polyomavirus 1), das Trichodysplasia-Spinulosa-Polyomavirus (humanes Polyomavirus 8) und das Merkelzell-Polyomavirus (humanes Polyomavirus 5). Die ausgelöste Erkrankung hängt von dem jeweiligen Virus ab: das BK-Virus löst sowohl die BKV-assoziierte Nephropathie (BKNV) bei immunsupprimierten, meist Nieren-transplantierten Patienten, als auch eine hämorrhagische Zystitis bei Knochenmark-transplantierten Patienten aus [7, 18-23]. Das Trichodysplasia-Spinulosa-Polyomavirus hingegen immunsupprimierte betrifft ebenfalls Patienten, meist nach Organtransplantation und ruft eine sehr seltene Hauterkrankung, die namensgebende Trichodysplasia spinulosa, hervor [12, 24, 25]. Das vierte, humanpathogene Polyomavirus ist das Merkelzell-Polyomavirus, das als einziges Virus aus dieser Gruppe in direkter Assoziation bzw. Verbindung zu Krebs, dem namensgebenden neuroendokrinen Merkelzellkarzinom, steht. Das vorwiegend an Licht-/UV-Strahlen- exponierten Stellen der Haut auftretende, hoch aggressive Karzinom kommt überwiegend bei älteren und immunsupprimierten Patienten vor [10, 26, 27]. Die durch das JC-Virus ausgelöste Erkrankung, die progressive multifokale Leukenzephalopathie (PML), sowie Assoziationen zu weiteren Krankheitsbildern werden in einem gesonderten Kapitel näher beschrieben.

1.1.2 Aufbau und genomische Struktur

Das JC-Virus ist – wie auch die anderen Vertreter der Polyomaviren – ein nicht-behülltes Virus, welches ca. 45 nm im Durchmesser breit ist und als Erbinformation eine doppelsträngige, zirkulär angeordnete DNA aufweist. Das ikosaedrisch aufgebaute Viruskapsid setzt sich aus dem Hauptstrukturprotein VP1 sowie den zwei weiteren Strukturproteinen VP2 und VP3 zusammen - VP steht hierbei für *viral protein* [28]. Fünf einzelne VP1-Moleküle setzen sich zu einem Pentamer zusammen – von diesen Pentameren findet man insgesamt 72 im Viruskapsid, die jeweils mit einem Einzelmolekül VP2 oder VP3 verbunden sind [29]. Diese werden zwar nicht zwangsläufig für die Selbstmontage des Virus benötigt, verleihen ihm aber eine strukturelle Stabilität [30, 31]. Lediglich VP1 ist auf der Oberfläche des Kapsids exponiert und definiert somit maßgeblich die Rezeptorspezifität [28].

Das Prototyp-JCV-Genom umfasst in der Regel 5130 Basenpaare [32] und ist in Mini-Chromosomen mit den Histonen H2A, H2B, H3 und H4 verpackt – das Linker-Histon H1 fehlt [33]. Es kodiert für 6 Virusproteine, darunter fallen die bereits erwähnten Strukturproteine VP1, VP2 und VP3, das große T-Antigen (large T antigen), das kleine t-Antigen (small t antigen) und das Agnoprotein sowie mehrere, durch alternatives Spleißen generierte Varianten des großen T-Antigens - T¹³⁵, T¹³⁶ und T´165 [34, 35]. Das zirkuläre Genom wird in eine frühe und eine späte Genkassette (bzw. in einen frühen und einen späten Transkriptionsbereich) eingeteilt – diese werden durch einen nicht für virale Proteine kodierenden, lediglich kontrollierenden Genbereich, die s.g. Noncoding control region (NCCR), getrennt. Diese NCCR, oft auch als regulatory region (RR) oder hypervariable regulatory region (HVRR) betitelt, beinhaltet neben dem Replikationsursprung, dem origin of replication (ORI), Enhancer-Elemente. An diese wiederum können verschiedene mehrere Promotor- und Transkriptionsfaktoren zur Verstärkung bzw. Regulation der Transkription binden [36, 37]. Diese NCCR ist - im Gegensatz zu der überwiegend konservierten frühen und späten Genkassette - der variabelste Teil des JCV-Genoms und bestimmt maßgeblich den "Charakter" des Virus sowie dessen Virulenz und Neurotropismus [38, 39]. Hinsichtlich der Struktur der NCCR existieren zwei unterschiedliche Typen des JC-Virus: zum einen JCV mit der Archetyp-NCCR, zum anderen JCV mit einer PML-Typ-NCCR, die sich dadurch definiert, dass sie Mutationen, Rearrangements und weitere Veränderungen im Vergleich zur hoch konservierten Archetyp-NCCR aufweist. Der Archetyp ist der "Wildtyp", da er der in der Umwelt am häufigsten nachweisbare und vorkommende Stamm ist [40]. Der Archetyp ist in sechs Regionen gegliedert, die von A-F benannt sind. Jede Region hat unterschiedlich viele Basenpaare (bp): Region A hat 25 bp, B 23 bp, C hat 55bp, D 66 bp, E hat lediglich 18bp und Region F weist 69 bp auf [41]. Im Rahmen der PML kommt es zu Veränderungen in dieser Region (genetisch weg vom Archetyp hin zum PML-Typ) im infizierten Individuum [42] - auf solche möglichen Mutationen und Veränderungen in der NCCR und deren Bezug zur PML wird in einem eigenen Kapitel eingegangen.

Die frühe Genkassette liegt auf der ORI-zugewandten Seite der NCCR und wird in der Regel vor der DNA-Replikation entgegen des Uhrzeigersinns abgelesen; der späte Genbereich hingegen ist auf der ORI-abgewandten Seite der NCCR lokalisiert und wird zeitgleich oder nach der DNA-Replikation im Uhrzeigersinn abgelesen und transkribiert.

Vor der DNA-Replikation werden die frühen Proteine von dem frühen Genbereich bzw. der frühen Genkassette transkribiert - darunter fallen das große T-Antigen, das kleine t-Antigen sowie die durch Spleißen generierten T-Antigen-Varianten. Dies sind multifunktionelle Proteine, die an der viralen Transformation, der Genregulation des Zellzyklus sowie der Zelltransformation beteiligt sind [37, 39]. Ein Dreh- und Angelpunkt stellt das DNA-bindende, große T-Antigen dar. Dieses wird nach Eindringen des JC-Virus in den Zellkern der Wirtszelle im Rahmen der Transkription der frühen Proteine gebildet. Es supprimiert im Rahmen eines Feedback-Mechanismus die frühe Transkription und stimuliert gleichzeitig die Replikation der viralen DNA sowie die Transkription der späten Proteine, die zeitlich versetzt zur frühen Transkription beginnen. Die DNA-Replikation fördert das große T-Antigen, indem es ruhende (also nicht in Teilung befindliche) Zellen in die S-Phase des Zellzyklus überführt. Dadurch werden für die virale Replikation notwendige Proteine/Enzyme, wie die Polymerase α , von der Wirtszelle bereitgestellt [39]. Die Überführung in die S-Phase gelingt über Aktivierung verschiedener Signalwege (u.a. durch Bindung an Proteine der Rb (Retinoblastoma)-Familie), die zum konsequenten Fortschreiten des Zellzyklus beitragen [43]. Da das große T-Antigen spezifisch mit Komponenten der humanen DNA-Polymerase bzw. der DNA-Polymerase von Primaten interagiert und man beide Komponenten für eine suffiziente Replikation der viralen DNA braucht, schränkt es die Auswahl an möglichen Wirtszellen als Replikationsort für JCV stark ein [28, 44]. Über das Zusammenwirken des großen T-Antigen mit den zellulären Proteinen Pur α und YB-1, die gemeinsam wie ein "genetischer Schalter" fungieren, verschiebt sich die Genexpression/Transkription von den frühen zu den späten Proteinen [45]. Die Aktivität des großen T-Antigens wird über Phosphorylierungen bzw. seinen Phosphorylierungsstatus reguliert [46].

Das kleine t-Antigen stellt ebenfalls einen wichtigen Kontrollpunkt in der viralen Replikation sowie dem Fortschreiten des Zellzyklus dar, was man anhand der Proteine, die mit dem kleinen t-Antigen interagieren, erkennen kann. Dies sind zum einen Proteine der Rb-Familie, zum anderen die Proteinphosphatase 2A (PP2A) [47]. Die Proteine der Rb-Familie und ihre Rolle im Zellzyklus wurden bereits in Bezug auf das große T-Antigen thematisiert. Durch die Interaktion des kleinen t-Antigens mit der PP2A wird die Dephosphorylierung des späten Agnoproteins verhindert, welches wiederum eine entscheidende Rolle in der Zellproliferation und hinsichtlich einer verstärkten viralen Replikation hat [28, 48].

Die Splice-Varianten des großen T-Antigens, T´135, T´136 und T´165 interagieren mit weiteren Mitgliedern der Rb-Familie, nämlich mit den zellulären Proteinen p107 und p130, und können deren Phosphorylierungsstatus ändern. Die Proteine p107 und p130 sind Zellzyklusregulatoren und durch Interaktion mit den T´-Varianten führen sie zum Eintritt der Zelle in die S-Phase [28, 39, 49].

Auf der späten Genkassette sind die drei Strukturproteine VP1, VP2 und VP3, das akzessorische, regulatorische Agnoprotein und zwei Mikro-RNAs (*Ribonucleic acid*) kodiert. Diese werden nach Transkription der frühen Proteine und während bzw. nach der viralen DNA-Replikation auf dem gegenüberliegenden Strang des zirkulären Genoms in gegenläufiger Richtung (also im Uhrzeigersinn) abgelesen [28]. Die drei Strukturproteine bilden, wie oben erwähnt, das ikosaedrisch aufgebaute Viruskapsid. Dabei hat VP1 maßgebliche Funktionen bei der Bindung an und dem Eintritt in die Wirtszelle sowie beim Einschleusen viraler Partikel in den Zellkern der Wirtszelle [28, 39]. Das

Agnoprotein ist – ähnlich wie das große T-Antigen – ein multifunktionelles Protein, dem neben seiner Rolle im replikativen Lebenszyklus von JCV verschiedene Aufgaben zugeschrieben werden [50]: einerseits hat es onkogenes Potential durch die Hemmung der DNA-Reparatur im Wirt sowie aufgrund seiner Assoziation zu mehreren Tumorsupressorproteinen und führt somit zu einer unkontrollierten Zellproliferation [39, 51]. Andererseits fungiert es als Viroporin und ist somit in die Virusvermehrung und -freisetzung involviert [52]. Die beiden Mikro-RNAs sollen im Rahmen eines negativen Feedback-Mechanismus das große T-Antigen herunterregulieren – dies erreichen sie durch aktive Initiation der Spaltung der frühen mRNA (*messenger ribonucleic acid*), die u.a. für das große T-Antigen kodiert [53].

1.1.3 Infektionsweg und Krankheitswert

Die Durchseuchungsrate mit JCV in der Bevölkerung ist mit Seroprävalenzwerten zwischen 40% und 60% sehr hoch. Hierbei ist hervorzuheben, dass die allgemeine Durchseuchungs- und Serokonversionsrate mit steigendem Alter zunimmt, so liegt sie bei 70-Jährigen bei ca. 70% [54-57]. Der in der Regel asymptomatisch, ohne klinische oder pathologische Folgen verlaufende Erstkontakt mit dem Virus ereignet sich meist im Kindes- und Jugendalter [39, 58]. Hierbei werden verschiedene Transmissionsarten angenommen. Einerseits wird eine Übertragung innerhalb der Familie (bzw. langfristiger Lebensgemeinschaften) von den Eltern auf die Kinder vermutet bzw. eine Mensch-zu-Mensch-Übertragung – eine transplazentare Transmission erscheint eher unwahrscheinlich [59-62]. Andererseits kann es aber auch zu Kontakt mit JCV über die Umwelt in Form von kontaminierten Lebensmitteln, Wasser, Oberflächen oder Böden kommen [63, 64]. Die breite Verteilung des [C-Virus in der Umwelt lässt sich u.a. damit erklären, dass ca. 20-30% der mit JCV-infizierten Menschen den JCV-Archetyp natürlich im Urin ausscheiden – ein wichtiger Fakt für die Transmission des Virus [28, 65]. Untersuchungen zeigten, dass es sich hierbei eher um eine persistente, als eine rezidivierende Infektion exogenen Ursprungs handelt [66, 67]. Die Vermutung der horizontalen, fäkal-oralen Transmission wird durch den Nachweis von JCV-DNA in Stromazellen der Tonsillen/des Oropharynx bzw. im Lymphgewebe des Darms von infizierten Personen untermauert - diese werden als Ort des Erstkontaktes mit dem Virus bzw. als Erstinfektionsort betrachtet [39, 68, 69]. Von diesem initialen Infektionsort wird das Virus vermutlich über die hämatogene Route (in Form von infizierten Lymphozyten) zu sekundären Infektionsherden bzw. zu einem Ort der Latenz im Rahmen der initialen Virämie der Erstinfektion transportiert, wo es lebenslang persistieren kann [28, 39]. Dazu zählen insbesondere die Nieren, das Knochenmark und lymphatisches Gewebe [70-75]. Auch das Gehirn wird als Ort der Viruspersistenz vermutet, da das JC-Virus sowohl bei gesunden Personen als auch bei immunsupprimierten Patienten ohne PML detektiert werden konnte [76-79]. Im Rahmen einer Immunsuppression bzw. veränderten zellulären Immunantwort kann sich das Virus aus dem Ort der Persistenz reaktivieren, die Blut-Hirn-Schranke überqueren, Oligodendrozyten infizieren und mit der lytischen Replikation beginnen – ab diesem Punkt zeigt sich das klinische Bild der durch JCV ausgelösten Erkrankung, der progressiven multifokalen Leukenzephalopathie [28].

Viele Fragestellungen hinsichtlich der viralen Route im menschlichen Körper konnten bisher nicht klar beantwortet werden: es ist weiterhin nicht abschließend geklärt, wo der genaue Shift (also die Veränderungen/Mutationen bzw. *Rearrangements*) bzw. die Aktivierung vom eigentlich harmlosen Archetyp-Virus hin zum neurovirulenten PML-Typ-Virus stattfindet [28, 66]. Einerseits ist es möglich, dass dies direkt im Gehirn als Ort der Latenz stattfindet, während das Virus dort persistiert, sich unter Immunsuppression des Wirts und geringerer immunologischer Überwachung reaktiviert bzw. neuroadaptiert und in eine neuroinvasivere Form übergeht [36, 80]. Andererseits ist es auch möglich, dass die Veränderungen in der NCCR außerhalb des Gehirns stattfinden – möglicherweise in den B-Lymphozyten und im Knochenmark, vermutlich eher nicht in der Niere [40]. Insbesondere die B-Lymphozyten im und außerhalb des Knochenmarks, in denen natürlicherweise eine VDJ-Umlagerung stattfindet, stellen einen gut vorstellbaren Ort für die NCCR-Umlagerung dar [81, 82]. Diese veränderten neurovirulenteren JCV-Varianten wandern über infizierte Lymphozyten (quasi wie ein trojanisches Pferd), gebunden an der Oberfläche von Lymphozyten oder als freie Virionen ins Gehirn und infizieren dann Oligodendrozyten und CD34+ hämatopoetische Vorläuferzellen in Frage [74, 84]. Weiterhin ist noch nicht abschließend geklärt, ob die PML-NCCR-Varianten im Rahmen eines umfassenden Veränderungs- und Selektionsprozesses entstehen und somit verschiedene, unterschiedlich häufig vorkommende NCCR-Varianten im Liquor/Gehirn bzw. am Latenzort existieren. Diesem Gedanken folgend muss noch umfassender untersucht werden, ob die im Liquor/Gehirn nachweisbare bzw. dominierende NCCR-Variante auch diejenige ist, die in der Peripherie dominiert.

Aktuelle Ergebnisse deuten darauf hin, dass die dominierende JCV-NCCR-Variante zwischen den unterschiedlichen anatomischen Kompartimenten innerhalb eines Patienten differieren kann, aber nicht muss [85]. Zudem ist häufig eine patientenspezifische Zusammensetzung von JCV-NCCR-Varianten bzw. Quasispezies im Liquor bzw. Gehirn von PML-Patienten zu finden [86-88]. Weiterhin kann es zu einer Veränderung der dominierenden JCV-NCCR-Variante im Liquor/Gehirn während der aktiven Infektion und massiven Replikation innerhalb weniger Tage bei PML-Patienten kommen [85, 89]. Wenn es zu einer Besserung der klinischen Situation mit Abfall der Viruslast kommt, ändert sich die Komposition der NCCR-Varianten meist nicht mehr [89].

Unterschiedliche Ergebnisse aus verschiedenen Studien lassen die These zu, dass die virale Route und der Entwicklungs- und Krankheitsprozess der PML in Bezug auf die JCV-NCCR-Varianten auf der Makroebene nicht bei allen Patienten gleich zu sein scheint. Bezüglich der Mikroebene (also dem Viruseintritt in die Zelle sowie dessen Lebenszyklus in der Zelle) scheint es keine signifikanten Unterschiede zu geben, diese soll im Folgenden nun näher beleuchtet werden.

Das Virus kann sich nur durch Benutzen der "Replikationsmaschinerie" der Wirtszelle vervielfältigen. Hierfür muss es zunächst in eine passende Wirtszelle mit einem passenden Rezeptormotiv (konkret heißt dies ein Motiv mit einer α 2,6-verknüpften Sialinsäure sowie einer ausgeprägten L-Form) eindringen [38]. Zunächst bindet das Viruskapsidprotein VP1 an die Zelle über ein spezifisches Zuckermolekül, dem Pentasaccharid LSTc (*Lactoseries tetrasaccharide c*), welches diese zwei notwendigen Rezeptoreigenschaften aufweist [90, 91]. Der endgültige Eintritt in die Wirtszelle bzw. in die Oligodendrozyten gelingt dem Virus durch rezeptorvermittelte Clathrin-abhängige Endozytose [92], wobei der Serotoninrezeptor 5-HT2A diesen Eintritt erleichtert [93, 94]. Nach Eintritt in die Zelle wird es in Form eines Endosoms in das endoplasmatische Retikulum der Zelle aufgenommen, wieder in das Zytoplasma ausgeschleust und dringt über Poren in den Zellkern der Wirtszelle ein. Dort finden die Transkription der viralen frühen Proteine, die virale Replikation und die Transkription der viralen späten Proteine (in dieser Reihenfolge) jeweils mit Nutzung der Enzyme und Proteine der Wirtszelle statt. Die Translation der frühen bzw. späten Proteine erfolgt direkt nach Bildung der kodierenden mRNA im Zellkern. Im letzten Schritt werden alle Virusbestandteile inklusive der replizierten viralen DNA zusammengebaut und die neu gebildeten Viruspartikel schleusen sich aus der Wirtszelle aus – bereit, um weitere Wirtszellen zu infizieren [95]. Dies geschieht vermutlich im Rahmen eines lytischen nicht-apoptotischen Zellprozesses [96].

Neben der progressiven multifokalen Leukenzephalopathie ist das JC-Virus aber auch in einigen, seltenen Fällen mit anderen Krankheitsbildern assoziiert – darunter fallen weitere ZNS (Zentrales Nervensystem) - Erkrankungen wie die JCV-Enzephalopathie (JCVE), die JCV-Meningitis und die *JCPyV granule cell neuronopathy* (JCPyV-Körnerzell-Neuropathie) sowie die JCPyV-assoziierte Nephropathie [97-101]. Die Rolle von JCV in der Karzinogenese von ZNS-Tumoren und Tumoren außerhalb des ZNS als Auslöser bzw. als beeinflussender Faktor wird als möglich erachtet, ist aber noch nicht abschließend geklärt [102, 103].

1.1.4 Geschichte

Die durch das JC-Virus ausgelöste Erkrankung, die progressive multifokale Leukenzephalopathie, kannte und definierte man bereits als solche, bevor man den eigentlichen Verursacher bzw. Auslöser (also das JCV) detektieren und isolieren konnte. Die PML, die durch sie ausgelöste neurologische und schnell fortschreitende Symptomatik sowie die charakteristischen, demyelinisierenden Läsionen im Gehirn wurden erstmalig 1958 anhand von drei Fallberichten in der Literatur beschrieben, wobei sie damals als seltene Komplikation bei Patienten mit einer chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) oder einem Hodgkin-Lymphom geführt wurden [104]. Die zu dieser Zeit bekannten PML-Patienten wiesen in den betroffenen Hirnarealen bioptisch bzw. histopathologisch (post mortem) die für die PML klassische Trias – Demyelinisierung, veränderte astrozytäre Morphologie sowie nukleare Einschlüsse in Oligodendrozyten - auf, die auch heute noch aktuell und gültig ist [105]. Aufgrund von detektierten Einschlusskörpern in Oligodendrozyten und Astrozyten [104, 106] wurde die Hypothese, dass ein viraler Erreger Auslöser der neurologischen Erkrankung sein könnte, bereits 3 Jahre später gestellt [107] und durch elektronenmikroskopische Beobachtung von Viren in Gehirnarealen, die von der PML betroffen waren, untermauert; anhand ihres morphologischen, mikroskopischen Erscheinungsbilds ordnete man diese neu entdeckten Viren der Familie der Papovaviren zu [108, 109]. Schließlich dauerte es noch bis 1971, bis das mikroskopisch beobachtete Virus erstmalig aus der Biopsie eines PML-betroffenen Gehirnareals isoliert und kultiviert werden Dies gelang Padgett et. al bei einem 38-jährigen Patienten (John Cunningham) mit konnte. gesichertem Hodgkin-Lymphom und PML-typischen neurologischen Symptomen, dessen Initialen JC namensgebend für das neue Papovavirus waren [1]. Im gleichen Jahr wurde der andere wichtige Vertreter aus der Gruppe der Papovaviren, das BK-Virus, im Urin eines nierentransplantierten Patienten mit Ureterobstruktion entdeckt; auch hier war der im Fallbericht beschriebene Patient bzw. dessen Initialen namensgebend für das neue Virus [7]. Aufgrund der Größe ordnete man beide neuen Virusspezies einer Untergruppe der Papovaviren, den Polyomaviren, zu.

Die Inzidenz der PML blieb viele Jahre nach ihrer erstmaligen Entdeckung und Klassifizierung äußerst gering und trat überwiegend bei Patienten mit einer lymphoproliferativen Erkrankung auf [110]. Als Anfang der 1980er Jahre die durch das HI-Virus (*human immunodeficiency virus*) ausgelöste immunsupprimierende AIDS-Erkrankung (*Aquired immunodefficiency syndrome*) pandemische Ausmaße erreichte, schnellte die Zahl der PML-Fälle – im Vergleich zu den vorherigen 3 Jahrzehnten - drastisch in die Höhe [111, 112]. Dass die durch das JC-Virus ausgelöste Erkrankung überhaupt eine fatale Komplikation bei AIDS-Patienten sein könnte, wurde durch erste Fälle der PML bei AIDS-Patienten in New York und Miami 1982/83 festgestellt [113, 114]. Bei 55-85% der PML-Fälle zu der

damaligen Zeit war AIDS die zugrunde liegende Grunderkrankung [115]. Die durch JCV ausgelöste Krankheit wurde zur AIDS-definierenden Erkrankung, in ca. 2-5% der AIDS-Erkrankten brach die Krankheit aus [116-118].

Durch die Einführung antiretroviraler Medikamente (HAART – highly active antiretroviral therapy) als Standardtherapie bei HIV-positiven bzw. an AIDS erkrankten Patienten sank sowohl die durchschnittliche Inzidenz an AIDS-Erkrankten als auch die Zahl der an AIDS Verstorbenen, während die durchschnittliche Lebenserwartung eines Patienten mit der Diagnose HIV bzw. AIDS stetig stieg [119]. Wie die PML-Inzidenz mit der AIDS-Inzidenz Mitte der 1980er Jahre drastisch gestiegen war und in den frühen 1990er Jahren ihren Höhepunkt gefunden hatte, so fiel auch durch den Einsatz der HAART die Zahl AIDS-Erkrankter und somit auch signifikant die Rate an PML-Fällen, die als opportunistische Erkrankung im Rahmen von AIDS auftraten. Die PML-assoziierte Todesrate sank von ursprünglich 2,76 Todesfällen auf 100.000 Personen im Zeitraum von 1992-1995 auf 0,66 im Zeitraum von 2002-2005 [120]. Die PML-assoziierte Sterblichkeitsrate sank und immer mehr an PML erkrankte Patienten überlebten, allerdings mit gravierenden neurologischen Komplikationen und Einschränkungen [121]. Die antiretrovirale Therapie soll zur Wiederherstellung bzw. Verbesserung der Immunfunktion durch Supprimierierung des HI-Virus führen und stellt eine der wenigen Therapiemöglichkeiten für die HIV-assoziierte progressive multifokale Leukenzephalopathie dar. Diese musste (und muss auch noch heutzutage) bei HIV-Patienten sowie bei HIV-assoziierten PML-Patienten stets mit Bedacht begonnen werden. Bei zu schneller Rekonstitution des Immunsystems kann eine überschießende, fatale und manchmal tödliche Immunreaktion des Körpers auftreten, das s.g. immune reconstitution inflammatory syndrome (kurz IRIS) [122, 123].

In den Jahren 2004 und 2005 konnte eine neue Patientenpopulation beobachtet werden, die sich als gefährdet hinsichtlich der Entwicklung einer progressiven multifokalen Leukenzephalopathie zeigte: Patienten, die aufgrund einer immunvermittelten Erkrankung bzw. einer Autoimmunerkrankung wie der multiplen Sklerose (MS), mit zur damaligen Zeit neuen, hochpotenten, immunmodulatorischen Medikamenten behandelt wurden. Die ersten beschriebenen Fälle bei diesem "neuen" PML-Patientenkollektiv stellten Patienten mit Autoimmunerkrankungen (hier die schubförmig remittierende MS und Morbus Crohn) und gleichzeitiger Natalizumab-Therapie dar [124-126]. Natalizumab ist ein monoklonaler Antikörper, der als alpha4-Integrin-Antagonist die Migration von T-Lymphozyten über die Blut-Hirn-Schranke verhindert und so sehr wirksam zu weniger entzündeten Gehirnläsionen führt [127]. Nach kurzfristiger Rücknahme des Medikaments wegen der beschriebenen PML-Fälle 2005 wurde es nach Etablierung eines Risikomanagementplans wieder erneut auf den Markt eingeführt. Es ist auch heutzutage das wohl bekannteste, für das Entstehen einer PML prädisponierende Medikament - 2012 betrug die Rate an mit Natalizumab therapierten Patienten, die eine PML entwickelten, durchschnittlich 2,1 auf 1000 Patienten [128]. Allerdings sind auch andere Medikamente und monoklonale Antikörper wie Rituximab, Efalizumab, Infliximab oder Mycophenolat Mofetil mit der PML-Entstehung assoziiert [129-134], wobei Efalizumab wegen des erhöhten PML-Risikos 2009 vom Markt genommen wurde. Aktuelle Inzidenz- und Prävalenzraten bzgl. der PML variieren z.T. stark – abhängig von der jeweiligen Patientenpopulation und dem jeweiligen Land [135, 136].

Durch die gesteigerte Anwendung dieser Medikamente bei unterschiedlichen Krankheitsbildern (überwiegend Autoimmunerkrankungen und lymphoproliferative Erkrankungen), die die natürliche Funktion verschiedener Immunzellen unterdrücken, wächst die Gruppe an PML-gefährdeten Patienten. Dies macht konsequentes Monitoring bei Einsatz dieser Therapeutika unerlässlich, um sowohl die Morbidität als auch Mortalität zu senken [137, 138].

1.2 Progressive multifokale Leukenzephalopathie

1.2.1 Patientenkollektiv

Die progressive multifokale Leukenzephalopathie kann bei Patienten mit verschiedenen Krankheitsentitäten auftreten - gut erkennbar anhand des geschichtlichen Verlaufs der PML und der wechselnden Patientenkollektive, die von der PML betroffen waren und sind. Allen gemeinsam ist die krankheitsbedingte oder durch Medikamente induzierte Immunsuppression, konkreter die tiefgreifende Suppression der zellvermittelten Immunität, die den Hauptrisikofaktor für die PML darstellt [139]. Die Patienten mit Risiko für das Auftreten einer PML kann man bis auf wenige Ausnahmen grob drei verschiedenen Gruppen bzw. Ätiologien zuordnen: hämato-onkologische Erkrankungen, HIV-Infektion/AIDS und Autoimmunerkrankungen mit bzw. ohne immunmodulierende und/oder immunsuppressive Therapie [135]. Daten aus Schweden und Finnland aus den Jahren 2013/14 sehen Neoplasien bzw. Erkrankungen aus dem hämato-onkologischen Formenkreis als häufigste zugrunde liegende Ursache für die PML [136, 140]. Darunter fallen als Krankheiten u.a. das Hodgkin-Lymphom, das Non-Hodgkin-Lymphom, die CLL, die akute myeloische Leukämie (AML) und die Waldenström-Makroglobulinämie [141-143], wobei die hämatopoetische Stammzelltransplantation sowie der zunehmende Gebrauch von monoklonalen Antikörpern (wie Rituximab) mit steigenden PML-Inzidenzzahlen in dieser Patientengruppe assoziiert zu sein scheinen [129, 144].

Die zweite Patientengruppe mit entsprechendem Risikoprofil für die PML sind HIV-positive Patienten bzw. Patienten mit AIDS. Die PML-assoziierte Todesrate sowie Inzidenz unter HIV-positiven Patienten sind zwar durch den Einsatz der HAART gesunken [120, 145], die PML ist aber weiterhin eine AIDSdefinierende Erkrankung und tritt auch heutzutage noch in einem nicht zu vernachlässigenden Prozentsatz in dieser Patientenpopulation auf. Die niedrige Anzahl an CD4+-Lymphozyten ist hier eng verknüpft mit einer steigenden Wahrscheinlichkeit für das Auftreten der PML (eine CD4-Zellzahl <200 /µl ist mit einem erhöhten Risiko verbunden). Aber auch HIV-Patienten unter HAART und einer CD4-Zellzahl >200 /µl sowie Patienten kurz nach Beginn der HAART können häufiger von der PML betroffen sein – ein bemerkenswerter Unterschied zu anderen opportunistischen ZNS-Infektionen bei HIV-Patienten [146, 147].

Die dritte große Gruppe, bei der vermehrt PML-Fälle beobachtet wurden, sind Patienten mit Autoimmunerkrankungen, die unter immunmodulierender und/oder immunsuppressiver Therapie stehen. Hier ist insbesondere die Multiple Sklerose (und der Morbus Crohn) unter Therapie mit dem monoklonalen Antikörper Natalizumab zu nennen – wobei hier insbesondere das Risiko für die PML mit der Einnahmedauer des Medikaments steigt. Aber auch andere MS-Therapieansätze (wie Fingolimod, Alemtuzumab, Dimethyl-Fumarat) sind häufiger mit dieser ZNS-Erkrankung assoziiert [148].

Weitere Patienten mit dem Risiko für das Auftreten der PML sind Organ- bzw. Stammzelltransplantierte (autolog und allogen; bedingt durch die immunsuppressive Therapie zur Verhinderung einer Abstoßungsreaktion) [149, 150], Patienten mit primären Immundefekten [151] oder auch Patienten mit Erkrankungen des autoimmunologischen/rheumatologischen Formenkreises mit und ohne immunsuppressive Therapie. Darunter fallen u.a. die rheumatoide Arthritis, Vaskulitiden und der systemische Lupus erythematodes (SLE), meist in therapeutischer Verbindung mit Methotrexat, Rituximab, Infliximab oder Leflunomid [152]. Hier ist insbesondere der SLE mit dem höchsten PML-Risiko hervorzuheben [153].

Unabhängig von der Grunderkrankung gibt es eine Anzahl an Medikamenten, die generell das Risiko für eine PML erhöhen – darunter fallen neben den monoklonalen Antikörpern Chemotherapeutika, orale Glucocorticoide, Immunsuppressiva und andere s.g. *"disease modifying drugs"*. [135]

Vereinzelt werden PML-Fälle bei einem Patientenkollektiv, das lediglich einer geringen, okkulten oder keiner Immunsuppression oder Immundefizienz unterliegt, beschrieben – wie z.B. bei Patienten mit Leberzirrhose, Demenz oder chronischen Nierenerkrankungen [154]. Darüber hinaus wurde das Auftreten einer PML während der Schwangerschaft beschrieben sowie bei einer jungen Patientin, die bereits vor der Schwangerschaft neurologische Symptome zeigte, die im Laufe der Schwangerschaft aggravierten [155, 156].

1.2.2 Klinik und Diagnostik

Die progressive multifokale Leukenzephalopathie ist eine demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems, ausgelöst durch die Reaktivierung des JC-Virus im Gehirn. Die Erstbeschreiber der PML, Karl-Erik Aström et al., arbeiteten schon im Jahr 1958 die für diese ZNS-Erkrankung klassische, histopathologische Trias heraus - Demyeliniserung, veränderte astrozytäre Morphologie sowie nukleare Einschlüsse in Oligodendrozyten – die auch heutzutage noch aktuell und korrekt ist [104, 105]. Diese Charakteristika sind auf die Infektion der Oligodendrozyten (und zu einem kleineren Teil auch der Astrozyten), der daraus folgenden Lyse der Zellen und der fokalen Destruktion des Myelins zurückzuführen. Durch die zunehmende Demyeliniserung kommt es konsekutiv zu einer axonalen Dysfunktion und potenziell einer irreversiblen neuronalen Schädigung [28]. Diese Demyelinisierungsherde treten meist multifokal auf und erreichen Größendimensionen von einem Millimeter bis mehrere Zentimeter. Prinzipiell können sie in allen Bereichen des Gehirns bzw. der weißen Substanz vorkommen, bevorzugt treten sie aber periventrikulär und subkortikal im Frontalund Parietookzipitallappen auf. Ein Befall posteriorer Gehirnareale inklusive Stammhirn und Kleinhirn wird ebenfalls nicht selten beobachtet [105, 157, 158]. Der Name "Leukenzephalopathie" lässt primär einen Befall der weißen Substanz vermuten (der in Untersuchungen bei den allermeisten Patienten auch so beobachtet wird), allerdings findet man ebenso Demyelinisierungsherde in der grauen Substanz sowie durch das JC-Virus infizierte Gliazellen und Neurone des zerebralen Cortex [98, 159, 160]. Histopathologisch findet man meist nur Makrophagen am Läsionsort, die nicht durch JCV infiziert werden; Leukozyten (insbesondere CD8+-T-Zellen) treten primär perivaskulär im Rahmen des IRIS auf und zeigen eine zunehmende Immunrekonstitution und inflammatorische Immunantwort an [28].

Die Symptome, die bei einer PML auftreten können, sind sehr heterogen, da grundsätzlich jedes Gehirnareal betroffen sein kann. Zudem differieren die klinischen Manifestationen der PML je nach auslösender Grunderkrankung/Therapie, da es z.T. spezifische PML-Prädilektionsstellen für die verschiedenen Patientenkollektive gibt [105]. Zu Beginn kann die Erkrankung schleichend verlaufen und erste milde Symptome bzw. neurologische Defizite werden nicht direkt von den Betroffenen oder deren Angehörigen bemerkt bzw. als Schlaganfall missinterpretiert [28]. Im Verlauf von wenigen Tagen bis Wochen erreicht der Patient ein fortgeschrittenes Stadium i.d.R. mit mehreren

neurologischen Ausfällen, v.a. Verhaltensauffälligkeiten und kognitiven Einschränkungen, motorischer Schwäche und Ataxien, Dysathrie und Aphasie, visuelle Einschränkungen und Apraxien [105, 158]. Bei ca. 20-30% der PML-Patienten werden im Verlauf der Erkrankung Krampfanfälle beobachtet [161]. Das Auftreten von PML-Läsionen im Rückenmark ist extrem selten und nur in Einzelfallberichten beschrieben [162]. Eine Beteiligung des peripheren Nervensystems ist bei der PML bisher nicht dokumentiert worden [105].

Die Diagnose einer PML erfolgt anhand spezifischer Kriterien, die Klinik, Bildgebung, Laboranalytik bzw. histopathologische Eigenschaften aus einer Hirnbiopsie umfassen. Sie kann nicht allein anhand klinischer Symptome gestellt werden, da die differentialdiagnostische Abgrenzung zu anderen Erkrankungen nicht präzise möglich ist - beispielsweise bei MS-Patienten unter Natalizumab können Teile der o.g. Symptome auch für einen akuten Schub/Rückfall der MS sprechen [28, 158]. Um die definitive Diagnose "Progressive multifokale Leukenzephalopathie" stellen zu können, gibt es zwei Möglichkeiten. Zum einen kann man die Diagnose aus der Kombination von der zum Krankheitsbild passenden Klinik, entsprechenden radiologischen Befunden mit zur PML passenden Läsionen und dem Nachweis von JCV-DNA im Liquor über eine polymerase chain reaction (PCR) stellen – dies ist die in der Praxis deutlich häufiger verwendete und weniger invasive Methode. Ist eines dieser Kriterien nicht erfüllt, so wird der Fall als "wahrscheinliche" bzw. "mögliche" PML klassifiziert. Zum anderen ist eine Diagnosestellung über eine Hirnbiopsie mit Nachweis der für die PML typischen histopathologischen Trias (in Kombination mit immunhistochemischen Verfahren und dem PCR-Nachweis von JCV-DNA im Hirngewebe in meist exorbitant großen Mengen) möglich und kommt vor allem dann zur Geltung, wenn der JCV-Nachweis im Liquor negativ war und mögliche andere Ursachen für Klinik und Bildgebung größtenteils ausgeschlossen wurden [105, 163].

Die Bildgebung ist ein wichtiger Bestandteil im Findungsprozess der Diagnose. Die Magnetresonanztomographie (MRT) ist im Vergleich zur Computertomographie (CT) deutlich sensitiver bzgl. des konkreten Ausmaßes und der Anzahl von PML-Läsionen in der weißen Substanz. In der CT präsentieren sich PML-Läsionen hypodens in der betroffenen weißen Substanz, zeigen keinen Masseneffekt und sind in ca. 10% der Fälle schwach, peripher kontrastmittelanreichernd. In der MRT hingegen sind die PML-Läsionen in den betroffenen Regionen hyperintens in der T2-Wichtung und Flair-Sequenz, in der T1-Wichtung hypointens [105, 118, 157]. Wie bereits oben beschrieben, können die Läsionen multifokal und prinzipiell in jeder Gehirnregion vorkommen, obwohl die subkortikale und juxtakortikale weiße Substanz des Frontal- und Parietookzipitallappens am häufigsten betroffen ist und es meist – aber nicht immer – eine scharfe Abgrenzung zum Cortex gibt. Das Erscheinungsbild der PML-Läsionen im radiologischen Befund kann sich im Verlauf der Erkrankung ändern und dann ein sehr heterogenes Bild zeigen. Radiologische Verlaufskontrollen sind v.a. wichtig, um asynchrone Vergrößerung, Verschmelzen von Läsionen und das Auftreten neuer Läsionen zu detektieren bzw. zu beurteilen [66]. Bei mit Natalizumab-assoziierter PML beobachtet man meist ein monofokales Auftreten großer Läsionen (>3cm), bevorzugt subkortikal im Frontallappen, mit klarer Abgrenzung zum Kortex und unscharfer Grenze zur weißen Substanz in der T2-Wichtung [105, 164]. Die Abgrenzung zu anderen neurologischen (Infektions)krankheiten und deren radiologischem Erscheinungsbild (wie MS-Läsionen, AIDS-Demenz, Cytomegalievirus-Läsionen, ZNS-Vaskulitis, etc.) kann zumeist schwierig sein, ist aber fast immer anhand der Lokalisation der Läsion und insbesondere im Zusammenspiel mit Klinik und Untersuchungen des Liquors möglich [105].

Der dritte wichtige Pfeiler auf dem Weg zur korrekten Diagnose ist die Laboranalytik - insbesondere der PCR-Nachweis von JCV-DNA im Liquor. Eine generelle Untersuchung des Liquors hinsichtlich Zellzahl, Eiweißgehalt und Glukosegehalt kann hilfreich für den Ausschluss von Differentialdiagnosen sein [105]. Die im Liquor durchgeführte PCR-Testung auf das JC-Virus wies in den späten 1990er-Jahren eine Sensitivität von knapp 75% und eine Spezifität von knapp 96% auf, durch Verfeinerung der Techniken und Einführen der ultrasensitiven PCR konnte die Sensitivität - stark abhängig vom Patientenkollektiv, dem Zeitpunkt der PCR-Untersuchung im Verlauf der Erkrankung und der Größe der PML-Läsionen - auf Werte von 80 bis >95% gesteigert werden [105, 165-168]. Gelegentlich wird auch JCV-DNA bei nicht-PML-Patienten bzw. Patienten mit anderen neurologischen Krankheitsbildern nachgewiesen [169]. Ebenso schließt ein negativer Test auf JCV-DNA im Liquor bei Vorliegen charakteristischer klinischer und radiologischer Merkmale nicht die PML aus und stellt in dieser Konstellation eine diagnostische Herausforderung dar, der man am besten mit einer Hirnbiopsie zum Ausschluss bzw. Bestätigung der Diagnose begegnet [166]. Dementsprechend sollte ein negatives Testergebnis bei Vorliegen der restlichen für die PML passenden Diagnosekriterien stets vorsichtig bewertet werden. Die meisten Labore sind in der Lage, >200 Kopien JCV-DNA/ml zu detektieren. Patienten unter immunmodulierender Therapie bei Vorliegen von Autoimmunerkrankungen haben meist deutlich niedrigere Viruslasten als HIV-Patienten ohne HAART-Therapie, was eine Diagnosesicherung über diesen Weg schwierig machen kann [105].

Bei HIV-Patienten ist zudem die Bestimmung der CD4+-Lymphozyten hilfreich, da das Risiko bzw. die Wahrscheinlichkeit für eine AIDS assoziierte PML insbesondere bei einer Zellzahl < 200 Zellen/mm³ stark ansteigt. Hierbei ist allerdings anzumerken, dass gerade nach Einführung der HAART der prozentuale Anteil der HIV-PML-Patienten mit einer Zellzahl >200 Zellen/mm³ gewachsen ist im Vergleich zu der Zeit vor Einführung der antiretroviralen Therapie [105, 118].

1.2.3 Therapie und Prognose

Eine effektive (antivirale), in der Klinik etablierte Prophylaxe bzw. Therapie existiert zum jetzigen Zeitpunkt nicht. Dementsprechend sind die therapeutischen Optionen bei Auftreten einer progressiven multifokalen Leukenzephalopathie extrem begrenzt und fußen primär auf der möglichst schnellen Herstellung der Immunfunktion zur Bekämpfung des JCV, die individuell und abhängig von der Grunderkrankung sehr unterschiedlich zu realisieren ist: entweder durch Behandlung der Grunderkrankung, die die Immundefizienz auslöst (z.B. durch die HAART bei AIDS) oder durch Absetzen der immunmodulierenden/ immunsupprimierenden Medikamente (z.B. bei Natalizumab ausgelöster PML durch Plasmapherese) [170, 171]. Beim Post-Transplantierten oder hämato-onkologischen Patienten ist dies natürlich nur schwerlich zu realisieren, dementsprechend schlechter ist hierbei auch das klinische *Outcome* bzw. die Prognose [149]. Verschiedene Ansätze und Medikamente (u.a. Mirtazapin, Risperidon oder IL2) wurden z.T. *in vitro* [93, 172, 173], z.T. in einzelnen Fallberichten getestet [174-176] – allerdings mit begrenztem Erfolg [171].

Mit der Entwicklung der Immun-Checkpoint-Inhibitoren haben sich in einigen Bereichen der Medizin viele neue Möglichkeiten aufgetan. Immun-Checkpoint-Inhibitoren wie Pembrolizumab, Nivolumab oder Ipilimumab wirken durch die Blockade von Checkpoint-Molekülen wie PD1 (*programmed cell death protein 1*), PD-L1 (*programmed death ligand 1*) oder CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) und wurden ursprünglich für verschiedene onkologische Krankheitsentitäten entwickelt [177]. Im Rahmen von chronischen viralen Infektionen kann die erhöhte PD-1-Expression auf T-Zellen

und deren Aktivierung durch PD-L1 zu einer verminderten, beeinträchtigten Virusabwehr führen. Im in vivo Mausmodell konnte durch die Blockade des PD-1-Signalwegs die T-Zell-Antwort verbessert und konsekutiv die Viruslast gesenkt werden [178]. Untersucht man die PD-1-Expression auf T-Zellen von PML-Patienten, so zeigt sich eine vermehrte Expression des Checkpoint-Moleküls sowohl auf CD4+-, als auch auf CD8+-Lymphozyten. Insbesondere die JCV-spezifischen zytotoxischen CD8+-Zellen exprimieren vermehrt PD-1 im Vergleich zu den restlichen CD8+-Zellen. Dementsprechend lag die Hypothese nah, dass durch die PD-1-Signalwegblockade die JCV-spezifische T-Zell-Antwort bei PML-Patienten (also in vivo) verbessert werden könnte [179]. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten dies Rahmen von Einzelfallbeschreibungen bzw. sehr kleinen PML-Patienten-Kollektiv mit im Pembrolizumab [180-188] sowie Nivolumab [188-192] zeigen. Allerdings scheint diese neuartige Therapie nicht bei allen PML-Patienten (ähnlich erfolgreich) zu wirken, z.T. auch zu einer Verschlechterung des klinischen Zustands führt [193-198]. Darüber hinaus gibt es einzelne Berichte vom Auftreten der PML nach Nivolumab-Gabe aufgrund einer anderen Grunderkrankung, obwohl unklar ist, ob Nivolumab allein oder die Kombination aus verschiedenen Faktoren und Medikamenten ursächlich war [199].

Mögliche Gründe für diese Wirkunterschiede/Erfolgschancen liegen vermutlich in der auslösenden Grunderkrankung, dem Diagnosezeitpunkt seit Auftreten der ersten neurologischen Symptome und der Höhe der Viruslast zum Diagnosezeitpunkt. Eine hohe Viruslast scheint auch ohne Pembrolizumab-Therapie mit einem schlechteren klinischen Outcome bzw. einer schlechteren Prognose verknüpft zu sein, sodass vermutlich ein möglichst früher Beginn mit der Therapie am erfolgversprechendsten wäre [193, 200, 201]. Ein prätherapeutisches Screening der Patienten hinsichtlich eines Nutzen-Risiko-Verhältnisses bzgl. der Immuncheckpoint-Inhibitor-Therapie erscheint als nächster, notwendiger Schritt vor größer angelegten klinischen Studien [201-203]. Aktuelle Daten weisen darauf hin, dass Patienten, die (v.a. zu Beginn der Therapie) mit Immunsuppressiva behandelt wurden, ein schlechteres Ansprechen auf Immun-Checkpoint-Inhibitoren zeigen [204]. Da aber zum aktuellen Zeitpunkt keine effektivere bzw. zielgerichtete Therapie existiert, die in größerem Umfang getestet wurde, sollte diese zumindest jedem möglichen PML-Patienten angeboten werden [205].

Weitere, erfolgsversprechende therapeutische Strategien, die vereinzelt in vitro und an Patienten getestet wurden, umfassen die Gabe von Interleukinen zur Boosterung der T-Zell-Aktivität, die Impfung gegen JCV sowie der allogene Transfer von Polyomavirus-spezifischen T-Zellen – allerdings kann auch hier das patientenspezifische Outcome sehr unterschiedlich sein und sowohl zu einer klinischen Verbesserung bzw. Stabilisierung führen, als auch zu einer rapiden Verschlechterung [206]. Ein Knackpunkt in der Entwicklung vielversprechender Therapeutika gegen JCV und die PML ist das Fehlen eines entsprechenden Tiermodells, das die verschiedenen Faktoren der Erkrankung (wie virusspezifische und wirtsspezifische Faktoren/Determinanten sowie Faktoren hinsichtlich der zugrundeliegenden immunsupprimierenden Erkrankung/Behandlung) und deren Zusammenwirken berücksichtigt, da diese ebenfalls durch ein fehlendes Tiermodell nicht abschließend geklärt sind [207, 208]. Zudem zeigen die humanen Polyomaviren eine starke Spezies-Spezifität (d.h. sie brauchen humanspezifische Replikationsproteine). In den vergangenen Jahren wurden einige Hürden diesbezüglich überwunden [209, 210]. Einige Erkenntnisse schöpft man aber auch aus dem Tiermodell mit dem Maus-Polyomavirus (MuPyV), das einige pathogene Eigenschaften mit JCV teilt. Dies ist zur Entwicklung neuer spezifischer Therapeutika nicht direkt geeignet, kann aber wichtige Hinweise zum Infektionsweg des JC-Virus, der Pathogenese der PML und weiteren wichtigen Determinanten liefern und so für das Risikostratifizieren von Patienten nützlich sein [211].

Über langfristige Folgen und den klinischen Zustand von PML-Langzeitüberlebenden ist bisher wenig veröffentlicht worden. Bei PML-Langzeitüberlebenden bedingt durch HIV wurde eine Stabilisierung bzw. leichte Verbesserung der klinischen Situation durch einen frühen Beginn der HAART in ca. 40-80% der Fälle erreicht, wobei hervorzuheben ist, dass ein Großteil der Patienten (ca. 75%) durch die PML eine bleibende neurologische Behinderung von sich trägt, die bei knapp 40% der Patienten als moderat bzw. schwer eingestuft wird [212]. Ca. 45% der Überlebenden entwickeln im weiteren Verlauf (behandlungspflichtige) Krampfanfälle, die eine beeinträchtigende Komorbidität darstellen können [213].

Bei vielen klinisch stabilen PML-Langzeitüberlebenden kann auch noch Jahre nach Diagnosestellung und trotz Auftreten eines *IRIS*, das eine Immunrekonstitution und aktive Bekämpfung des Virus anzeigt, JCV-DNA im Liquor bzw. *post mortem* im Gehirn nachgewiesen werden. Dies spricht prinzipiell gegen eine vollständige Beseitigung des Virus im ZNS trotz arbeitenden Immunsystems [66, 214, 215].

Es gibt vereinzelte Fälle von PML-Überlebenden, bei denen im Verlauf erneut eine PML mit aktivem JCV-Nachweis im Liquor diagnostiziert werden konnte [216]. 23 MS-Patienten, die eine PML im Rahmen der Natalizumab-Therapie entwickelt hatten, zeigten keinen Rückfall bzw. klinische Verschlechterung durch die Gabe von anderen immunmodulierenden MS-Therapeutika wie Fingolimod [217]. Dennoch bleibt es für diejenigen Patienten ein Dilemma, bei denen die PML primär durch immunmodulierende/immunsuppressive Therapeutika ausgelöst wurde, ob nach Auftreten schwerwiegenden neurologischen Erkrankung mit wirkähnlichen dieser Medikamenten weiterbehandelt werden kann und man so in der Folge das Wiederauftreten der PML riskiert oder nicht. Bei einer zunehmend steigenden Zahl an PML-Überlebenden wird es im Rahmen von größer angelegten Studien notwendig sein, Tools zur Risikostratifizierung für eine PML generell und konsekutiv für einen PML-Rückfall zu entwickeln [66].

1.3 Mit der PML assoziierte Mutationen im Virus

1.3.1 Nicht-kodierende Kontrollregion (NCCR)

Dass die progressive multifokale Leukenzephalopathie nicht generell alle immunsupprimierten Patienten (unabhängig von ihrer Grunderkrankung) betrifft, lässt sich durch virus- und wirtsspezifische Faktoren erklären, die entweder die Wahrscheinlichkeit bzw. das Risiko für die PML erhöhen oder verringern. Zwei dieser virusspezifischen Faktoren sind zwei Genbereiche, in denen Mutationen auftreten können, die mit dem Auftreten der PML assoziiert sind: dies ist zum einen die Nicht-kodierende Kontrollregion (NCCR), zum anderen der für das VP1-Protein kodierende Genbereich [66].

Die nicht-kodierende Kontrollregion des JC-Virus ist der variabelste Teil im gesamten JCV-Genom. Bereits in den 1980er Jahren wurde festgestellt, dass bei einem PML-Patienten die NCCR des aus der Niere bzw. dem Urin isolierten JC-Virus nicht identisch war mit der NCCR des JCV, welches im Gehirn bzw. im Liquor nachgewiesen wurde [218].

Die erste Prototyp-NCCR-Sequenz wurde im Virus des namensgebenden Patienten John Cunningham im Gehirn nachgewiesen, da dort zum ersten Mal die Kultivierung des JCV erfolgreich war. Sie ist als "Mad-1"-Sequenz bekannt – benannt nach dem Ort Madison in Wisconsin, wo die Isolierung gelang [1]. 1983/84 wurde das Virus mit dieser Prototyp-Sequenz zum ersten Mal vollständig in seiner Basenabfolge analysiert [32, 219]. 1990 wurde die JCV-NCCR-Ursprungssequenz als "Archetyp" festgelegt sowie dessen spätere Aufteilung in 6 Sequenzblöcke. Diese Ursprungssequenz wurde im Urin von gesunden Probanden isoliert [41]. Die genaue Einteilung der 6 Sequenzblöcke mit den Buchstaben A-F, die durch den Vergleich der Mad-1-Sequenz mit der Archetypsequenz entstanden sind, nahmen Ault et al. im Jahr 1993 vor. Die Mad-1-Sequenz zeichnet sich durch die Sequenzblockreihenfolge A-C-E-A-C-E-F aus (siehe Abb. 1). Die Archetyp-Sequenz hingegen setzt sich aus A-B-C-D-E-F zusammen. Manche Blöcke in der Mad-1-Sequenz "fehlen" im Vergleich zum Archetyp (B und D), manche dagegen (A, C und E) sind dupliziert [42]. Die Aufteilung dieser Blöcke zeigt zugleich auch präferierte Stellen für NCCR-Strangbrüche und *Rearrangements* auf [42].



Abb. 1: Schematische Darstellung des JCV-Archetyps und des PML-Typs MAD1. Die Buchstaben sowie Nummern in Klammern beziehen sich auf das Gliederungs- und Nummerierungsschema des JCV-Archetyps; ORI = origin of replication (umfasst 12 bp).

Durch die Duplikation des Sequenzblocks A besitzt die Mad-1-Variante eine duplizierte TATA-Box – eine Nukleotidstruktur, die elementar für die Transkription der frühen und späten Genkassette ist [220]. Bei weiteren Sequenzierungen von JCV-Isolaten bei PML-Patienten aus dem Liquor/Gehirn konnte eine große Vielzahl verschiedener NCCR-Varianten (PML-Typ-NCCRs bzw. *"rearranged variants"*), die ähnlich wie die Mad-1-Sequenz Duplikationen und Deletionen enthielten, nachgewiesen werden [221]. Einige dieser Varianten wurden ähnlich wie die Mad-1-Sequenz nach ihrem Isolationsort und dem Zeitpunkt ihrer erstmaligen Sequenzierung benannt, wie z.B. die Mad-4-Variante oder Mad-8-Variante. Die Mad-4-Variante wurde ursprünglich aus den Gehirnen von PML-Patienten isoliert und wird heutzutage für Forschungsuntersuchungen im Labor genutzt. Sie ist nahezu identisch zur Mad-1-Sequenz, lediglich fehlt ein 17bp umfassender Sequenzbereich in dem duplizierten A-Block, der die zweite TATA-Box enthält [28, 221].

Die NCCR-Varianten bei PML-Patienten (vornehmlich im Liquor) können stark im Vergleich zum Ursprungs-Archetyp, aber auch zum Mad-1-Prototypen variieren. Schnell wurde die These aufgestellt, dass die PML-Typ-NCCRs aus dem ursprünglichen Archetyp während der Viruspersistenz im (immunsupprimierten) Wirt entstehen [42, 222, 223]. Dabei werden v.a. größere Insertionen bzw. Deletionen von vollständigen Sequenzblöcken, aber auch von Sequenzblockanteilen beobachtet. Einzelne Punktmutationen können auch nachgewiesen werden, aber die patientenspezifische JCV-NCCR-"Individualität" bzw. Varianz entsteht vornehmlich durch die größeren *Rearrangements, Tandem-Repeats* und Deletionen der Archetyp-Sequenzblöcke und Sequenzblockanteile [42, 66, 85]. Es wird angenommen, dass diese Veränderungen in der NCCR sequenziell im Rahmen der homologen Rekombination bei der viralen Replikation und Reaktivierung unter Immunsuppression entstehen. Vermutlich findet dieser *Rearrangement*-Prozess bei vielen immunsupprimierten Patienten statt – häufig mit nicht-lebensfähigen JCV-NCCR-Spezies als Ergebnis. Dies würde zumindest z.T. die insgesamt niedrige Inzidenz und Prävalenz selbst bei einem immunsupprimierten Patientenkollektiv erklären [66]. Bislang wurden viele unterschiedliche, meist einzigartige NCCR-Varianten, also PML-Typ-NCCRs auf der ganzen Welt veröffentlicht [76, 85, 88, 224, 225].

Der Archetyp wird in den allermeisten Fällen nur im Urin bzw. in der Niere sowohl bei immungesunden als auch bei immunsupprimierten Patienten nachgewiesen und nur sehr selten im Gehirn und Liquor von PML-Patienten. Umgekehrt werden genauso PML-Typ-NCCR bzw. Mad-1-artige NCCR überwiegend im Gehirn/Liquor von PML-Patienten isoliert und kaum im Urin [28, 41, 86, 223]. Wo dieser Switch vom Archetyp zum patientenindividuellen PML-Typ stattfindet, ist weiterhin nicht abschließend geklärt.

Die Veränderung des JC-Virus innerhalb seiner NCC-Region vom Archetyp hin zum PML-Typ ist wichtig für die Entstehung der PML, da die NCCR maßgeblich die Effizienz der viralen Replikation und Transkription, den zellulären Tropismus und damit die JC-Virulenz bestimmt [66, 226, 227]. Gosert et al. konnten mithilfe eines bidirektionalen Reporterplasmids in vitro zeigen, dass insbesondere die frühe virale Genexpression sowie die virale Replikationsrate durch unterschiedliche Rearrangements der NCCR-Sequenzblöcke (also verschiedene NCCR-PML-Typ-Sequenzen von PML-Patienten) im Vergleich zum Archetyp gesteigert war [85]. Die Replikationsfähigkeit wird durch die veränderte NCCR und den geänderten Gewebetropismus insbesondere auch in Gliazellen erhöht [66]. Detaillierte Untersuchungen der NCCR - insbesondere in Hinblick auf mögliche DNA-Bindungsproteine, die die virale Transkription fördern oder hemmen können – zeigten auf, dass durch die Deletionen meist negative/hemmende Transkriptionskontrollsignale verloren gehen und durch die Insertionen positive/fördernde Transkriptionskontrollsignale hinzugefügt bzw. dupliziert werden [66, 227, 228]. Durch die Duplikation von Block C werden mehr DNA-Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren der NF1-Familie gebildet, die besonders zur vollständigen Aktivierung der viralen Transkription im Gehirn bzw. in Lymphozyten beitragen [28, 229]. Dabei ist auch das Aneinandergrenzen von spezifischen Sequenzblöcken elementar – dadurch können neue fördernde DNA-Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren entstehen, wie die Bindestelle für "Spi-B", die an der Grenze zwischen Block A und C lokalisiert und wichtig für die frühe Genexpression ist [230, 231].

Um die vielen verschiedenen NCCR-Sequenzen zu klassifizieren und besser zu kategorisieren, wurde eine Nomenklatur mit vier verschiedenen Gruppen entwickelt – orientiert an der Integration/Insertion von Sequenzblöcken bzw. der Duplikation von Sequenzblockgruppen [232]. Diese 4 Gruppen bzw. NCCR-Typen werden mit IS, IR, IIS und IIR betitelt – alle wurden bisher im Gehirn und in peripheren Lymphozyten im Blut nachgewiesen. Typ IS (singulär, keine Insertionen) zeigt die simpelste Architektur auf (A-C-E-F), Typ IR (*Repeats*, keine Insertionen) hingegen ist wie der Mad-1-Prototyp bzw. wie die Mad-4-Sequenz aufgebaut, also mit den klassischen *Tandem-Repeats* (A-C-E-A-C-E-F). Der Typ IIS (singulär mit Insertionen) wird durch den Ursprungsarchetyp repräsentiert (A-B-C-D-E-F), Typ IIR-Sequenzen (*Repeats* und Insertionen) sind die klassischen *rearranged* Sequenzen und zeigen die größte Varianz der 4 Sequenztypen. Hierbei kommen sowohl die Sequenzblöcke B und/oder D, als auch *Repeats*/Wiederholungen anderer Sequenzblöcke - vornehmlich A, C und E - vor (z.B. A-B-C-E-B-C-E-F) [28, 232].

Abgesehen von den Veränderungen in der NCCR und unterschiedlichen NCCR im Gehirn/Liquor bzw. Serum und Urin, konnte mittels Tiefensequenzierung eine hochkomplexe Zusammensetzung von JCV-NCCR-Varianten im Liquor einzelner PML-Patienten nachgewiesen werden. Die Minorvarianten ließen sich ausgehend von der dominierenden Majorvariante durch einzelne Deletions- und Duplikationsprozesse ableiten – so liegt auch hier die Hypothese nahe, dass die unterschiedlichen Varianten im Rahmen eines kontinuierlichen Selektions- und Adaptationsprozesses entstehen [86].

1.3.2 VP1

Neben der NCCR können auch Mutationen im Genbereich des VP1-Proteins entstehen, die mit dem Auftreten, der Pathogenese und dem wahlweise aggressiven oder langsamen Verlauf der PML verknüpft sind [66]. Das VP1-Protein zählt zu den Proteinen, die auf der späten Genkassette kodiert sind. Es bestimmt maßgeblich die Rezeptorspezifität des Virus, da es das dominierende Oberflächenprotein darstellt. Mutationen in der Genregion bzw. in der Aminosäuresequenz, die für das Sialinsäurerezeptormotiv kodiert, können zu verstärktem und erleichtertem Eindringen des Virus in die Zelle führen [28]. Im Gegensatz zur NCCR werden hierbei primär keine größeren Rearrangements, sondern eher vereinzelte Nukleotiddeletionen beobachtet, die 711 Aminosäureveränderungen in den Oberflächenschleifen, den s.g. surface loops des VP1 führen. Diese Mutationen findet man eher bei den JCV-Varianten im Liquor bzw. in Hirnbiopsien mit PML-Typ-NCCR-Sequenzen, nicht jedoch bei Urin-JCV-Varianten [233]. Die Auswirkungen solcher Punktmutationen bzw. Nukleotidexzisionen auf das klinische Outcome von Patienten wird durchaus kontrovers diskutiert und ist abhängig von der Position dieser Mutation und damit auch von der geänderten Aminosäuresequenz. Zum einen werden bestimmte VP1-Mutationen an spezifischen Nukleotidpositionen bei Patienten mit einer PML, die langsam voranschreitet, nicht aggressiv das Gehirn befällt und eine günstige Prognose aufzeigt, beobachtet [234]. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass durch die veränderte Oberflächenstruktur neutralisierende Antikörper nicht mehr suffizient binden können, das Virus so der Kontrolle des Immunsystems entgeht und die Oligodendrozyten infizieren kann [233, 234]. Durch Mutationen in Rezeptorbindungsmotiven könnte das Virus der Bindung an (Pseudo)rezeptoren in der Peripherie entgehen und so ungehinderter in das Gehirn bzw. in den Liquorraum einwandern [235] – das Sialinsäurebindemotiv ist hier häufig von bzw. Aminosäuresubstitutionen betroffen. Mutationen Durch Veränderung in diesem Rezeptorbindemotiv könnte die Sialinsäure-abhängige Bindung an periphere Zellen verloren gehen und somit die Neuroinvasion des Virus begünstigen. Die sialinsäureunabhängige Bindung an Oligodendrozyten hingegen und damit die mögliche Infektion dieser Gehirnzellen ist durch die Mutation nicht betroffen und bleibt erhalten [236].

In vitro konnte gezeigt werden, dass selbst eine einzelne Aminosäuresubstitution im VP1-Bereich das Hämagglutinationsverhalten des Virus und somit auch die Interaktion mit verschiedenen Zellrezeptoren verändern kann [237].

Durch das bevorzugte Auftreten solcher VP1-Mutationen in den Liquor-JCV-Varianten (nicht im Urin) wird hier – ähnlich wie bei der NCCR – von einer initialen Infektion mit einem Ursprungstyp ausgegangen, der sich innerhalb des Wirts im Rahmen von verschiedenen Selektions- und Adaptationsprozessen zunehmend in Form von Nukleotiddeletionen bzw. -substitutionen in eine neurovirulentere Variante entwickelt, die das Auftreten der PML begünstigt [28, 235].

1.4 Ziele der Arbeit

In dieser Arbeit soll eine molekulare und funktionale Analyse der Nicht-kodierenden Kontrollregion (NCCR) des JC-Virus vorgenommen werden. Dafür werden die NCC-Regionen der im Liquor und Serum von PML-Patienten nachgewiesenen JC-Viren amplifiziert und im ersten Schritt nach Sanger sequenziert. Die dadurch detektierbare Consensussequenz der jeweiligen NCCR soll hinsichtlich des Auftretens von Deletionen, Duplikationen, Insertionen und *Rearrangements* von Sequenzblöcken

sowie Punktmutationen analysiert werden. Hierfür werden sie nach dem Archetyp-Schema annotiert. Etwaige Veränderungen sollen herausgearbeitet werden.

In einem nächsten Schritt soll die jeweilige Körperflüssigkeit (Liquor und Serum) auf das Vorhandensein von Minorvarianten/Quasispezies der JCV-NCC-Region untersucht werden. Dies gelingt durch eine Tiefensequenzierung der einzelnen Probe. Die detektierten Minorvarianten sollen auch nach dem Archetyp-Schema annotiert und im nächsten Schritt mit der dominierenden Majorvariante verglichen werden.

Im letzten Schritt sollen die möglichen Auswirkungen der Veränderungen/Mutationen in der NCCR auf die Replikationsfähigkeit des JC-Virus untersucht werden. Mithilfe eines bidirektionalen Reporterplasmids, in das die patienten- und probenspezifische NCCR hineinkloniert wurde, sollen diese Auswirkungen visualisiert werden. Dazu folgt nach Transfektion des jeweiligen Reporterplasmids in Eukaryonten folgt eine durchflusszytometrische Messung (*Fluorescence-activated cell sorting (FACS)*), die ihren Schwerpunkt auf die Analyse der frühen und späten Promotoraktivität legt. Insbesondere der Vergleich der Promotoraktivitäten der veränderten NCCR zur Promotoraktivität des Archetyps ist hierbei wichtig.

Diese 3 Untersuchungsschritte sollen Aufschluss über die genaue Pathophysiologie der PML sowie die virale Route im menschlichen Körper geben. Es ist weiterhin unklar, wo anatomisch gesehen der *Switch* von dem übertragenen Archetyp zum neurovirulenten PML-Typ stattfindet. Darüber hinaus soll untersucht werden, wie dieser *Switch* zum PML-Typ abläuft. Es ist möglich, dass es einen kontinuierlichen Adaptations- und Selektionsprozess im Gehirn gibt, der völlig losgelöst ist von der Peripherie. Andererseits ist es auch denkbar, dass in der Peripherie (vornehmlich in B-Lymphozyten) Veränderungen im Rahmen einer Selektion stattfinden, dabei Minorvarianten entstehen und die neurovirulenteste Variante ins Gehirn auswandert und sich dort potenziell nochmals an die Umgebung adaptiert. Der Zusammenhang zwischen diesen beiden Körperkompartimenten soll durch den Vergleich der im Liquor bzw. im Serum nachgewiesenen Consensussequenz sowie durch den Vergleich der jeweiligen Minorvarianten besser verstanden werden.

2 Material und Methoden

2.1 Beschreibung des Patientenkollektivs /Art und Menge der Proben

Für die Untersuchungen dieser Arbeit werden insgesamt 26 Proben von Patienten mit diagnostisch gesicherter und klinisch manifester progressiver multifokaler Leukenzephalopathie aus dem Zeitraum von Mai 2015 bis November 2019 verwendet. Bei den Proben handelt es sich um aus Liquor oder Serum extrahierte Virus-DNA-Eluate, die tiefgefroren bei -20°C gelagert wurden. Insgesamt werden 13 Liquor- und 13 Serumproben verwendet – hierbei handelt es sich um 10 Liquor-Serum-Probenpaare, die einem Patienten am genau gleichen Tag entnommen wurden, sowie 3 einzelne Liquor- und 3 einzelne Serumproben. Die 26 Proben lassen sich also 16 verschiedenen PML-Patienten zuordnen, von denen 12 männliche und 4 weibliche Patienten sind (Tabelle 1). Die Patienten werden im Folgenden durchnummeriert und mit einem Rautezeichen betitelt (#1 - #16). Betrachtet man das Gesamtkollektiv, so liegt der Mittelwert der Altersverteilung bei 62,4 Jahren bzw. der Median bei 65 Jahren. Der jüngste männliche Patient ist 37 Jahre alt, der älteste 84 Jahre. Der Mittelwert der Altersverteilung bei 66,5 Jahren. Die jüngste Patientin hingegen ist 55 Jahre alt, die älteste 87 Jahre. Der Mittelwert der Altersverteilung bei 66,5 Jahren. Die jüngste Frauen (n = 4) liegt bei 66,5 Jahren und der Median bei 62 Jahren.

Die Patienten weisen unterschiedliche Grunderkrankungen auf, die das Auftreten einer PML begünstigen – die Spanne reicht hierbei von verschiedenen, malignen Grunderkrankungen (diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom, Sezary-Syndrom, Bronchialkarzinom) hin zu verschiedenen Autoimmunerkrankungen (M. Bechet, Sarkoidose) unter immunmodulierender Therapie (z.B. der anti-CD20-Antikörper Rituximab). Bei 8 Patienten liegen uns keine Angaben zur Grunderkrankung vor, die das Auftreten der PML begünstigt hat.

Im Rahmen der routinemäßigen Diagnostik ist die JCV-DNA der einzelnen Proben qualitativ und quantitativ (JC-Viruslast) bereits bestimmt worden. Die Viruslast wird in Anzahl der JCV-Kopien pro ml angegeben. In Tabelle 1 sind Patienten mit Alter, Geschlecht, Probentyp (Liquor bzw. Serum), Viruslast und Grunderkrankung aufgeführt. Grundsätzlich lässt sich festhalten, dass die Höhe der Viruslast je nach Probe und Patient sehr stark variiert – z.T. sind nur knapp 1.000 Viruskopien pro ml nachweisbar, bei einer Probe hingegen über 1.000.000. Die niedrigste Viruslast in dieser Verteilung liegt bei 941 Kopien/ml, die höchste bei 1.230.000 Kopien/ml. Der Mittelwert der Viruslast (n = 26) liegt bei 155.843 JCV-Kopien/ml, der Median bei 15.769 JCV-Kopien/ml. Betrachtet man lediglich die Viruslasthöhe in den Liquorproben (n = 13), so lässt sich ein Mittelwert von 222.917 Kopien/ml und ein Median von 24.390 Kopien/ml ermitteln. Legt man den Fokus auf die Serumproben (n = 13), so beträgt der Mittelwert hier 88.769 Kopien/ml und der Median 7.620 Kopien/ml. Statistische Unterschiede zwischen den Liquor- und Serumproben bzw. deren Viruslasthöhe sind im Ergebnisteil dokumentiert.

Patienten-	Alter	Geschlecht	Proben-	Viruslast	Grunderkrankung/
nummer	in		typ	(Kopienzahl/	weitere Patienten-
(#)	Jahren			ml)	informationen
1	84	m	CSF	24.390	
			S	14.130	
2	59	W	CSF	17.408	Z.n. allogener
			S	960	Stammzell-
					transplantation
3	72	m	CSF	508.400	
			S	4.865	
4	70	m	CSF	1.230.000	Nicht-kleinzelliges
			S	127.000	Bronchialkarzinom
5	39	m	CSF	5.925	
			S	23.949	
6	58	m	CSF	2.610	Sarkoidose
			S	7.620	
7	63	m	CSF	1.800	
			S	4.380	
8	65	W	CSF	734.484	Lymphom
			S	53.104	
9	87	W	CSF	46.653	
			S	941	
10	68	m	CSF	1.023	Angioblastäres T-Zell-
			S	162.000	Lymphom mit
					autologer KMT
11	37	m	CSF	283.646	M. Bechet unter
					Rituximab-Therapie
12	65	m	CSF	36.600	
13	38	m	CSF	4.980	
14	55	W	S	7.320	
15	69	m	S	6.930	Sezari-Syndrom unter
					Nivolumab-Therapie
16	69	m	S	740.800	Diffuses, groß-zelliges
					B-Zell-Lymphom unter
					Rituximab-Therapie

Tabelle 1: Auflistung der 16 Patienten, mit deren Proben in dieser Untersuchung gearbeitet wird. Angegeben sind die den Patienten in dem Versuch zugeordneten Patientennummern, ihr Alter (zum Abnahmezeitpunkt der Proben), Geschlecht, Probentyp sowie die in der jeweiligen Probe gemessene Viruslast. Von 10 Patienten liegen Liquor-Serum-Paare, die am gleichen Tag entnommen wurden, vor. Weiterhin werden 6 Einzelproben untersucht; m = männlich, w = weiblich, CSF = Cerebrospinal fluid (Liquor), S = Serum, KMT = Knochenmarkstransplantation

2.2 Probengewinnung

Alle in dieser Studie untersuchten Proben wurden im Rahmen der routinemäßigen Diagnostik am Institut für Virologie des Universitätsklinikums Düsseldorf (UKD) von extern (Deutschland und Schweiz) eingeschickt, gesammelt und verarbeitet. Die in dieser Untersuchung verwendeten Proben stammen aus dem Zeitraum von Mai 2015 bis November 2019. Das Institut für Virologie des UKD hat im Verlauf der letzten Jahre umfangreiche Erfahrungen mit der JC-Virus-Diagnostik gesammelt, sodass Einsender aus Deutschland und der Schweiz Liquor- und Serumproben zum Nachweis von JC-Virus-DNA nach Düsseldorf schicken. Hier wird mittels *Real-Time-PCR* (Nukleinsäureamplifikation virusspezifischer DNA) getestet, ob JC-Virus-DNA nachgewiesen werden kann und wie hoch die JC-Viruslast in der jeweiligen Probe ist. Das Verfahren der PCR wird weiter unten näher erläutert.

Hierfür erfolgt im ersten Schritt eine Nukleinsäureextraktion: dabei extrahiert man virale DNA und RNA aus 200 µl der Ursprungsprobe, also Liquor oder Serum und reinigt sie für weitere Analysen auf mittels BioRobot®EZ1[™] (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) unter Verwendung des EZ1®Virus Mini Kit v2.0 (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) über das Prinzip der Magnetpartikel-Technologie. Mit Teilen des Probeneluats wird die *Real-Time-PCR* zum qualitativen und quantitativen Nachweis der JCV-DNA durchgeführt.

Nach Bestimmen der JC-Viruslast werden die Proben als Eluate im Tiefkühl-Archiv des Instituts für Virologie bei -20°C tiefgefroren eingelagert. Für die vorliegende Analyse werden diese aufgetaut und in einem Kühlschrank bei 2° - 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.3 Material

2.3.1 Geräte

Geräte/Materialien	Hersteller bzw. nähere Angaben
6-well Platten	TC-Zellkulturplatten, 6 Well; Sarstedt AG & Co.
	KG, Nürnbrecht, Germany
Brutschrank	Thermo Scientific™ BBD 6220 Heraeus; Thermo
	Electron Corporation, Langenselbold, Germany
Durchflusszytometer	BD LSRFortessa [™] Cell Analyzer; Becton,
	Dickinson and Company, BD Biosciences; San
	Jose, California, USA
Falkon-Röhrchen	50 mL & 15 mL Arbeitsvolumen, Polypropylen-
	Schraubröhren; Sarstedt AG & Co. KG,
	Nürnbrecht, Germany
Filter	150 mm & 240 mm Durchmesser, Whatman™
	Folded Filters, GE Healthcare Life Sciences,
	Amersham, United Kingdom
Fluoreszenz-Mikroskop	Zeiss Axiovert 40 CFL Trinocular; Carl Zeiss

Bei der Durchführung der im weiteren Verlauf beschriebenen Experimente werden die in Tabelle 2 aufgeführten Geräte bzw. die dazugehörigen Materialien verwendet.

	Microscopy GmbH; Jena, Germany
Gelkammer	Horizontale Gel-Elektrophorese-Kammer; febikon
	Labortechnik GmbH, Wermelskirchen, Germany
Heizblock	eppendorf [®] ThermoStat plus; Eppendorf AG;
	Hamburg, Germany
PCR-Tubes	PCR Tube Strips 0,2 mL; Eppendorf AG;
	Hamburg, Germany
Pipetten	10 μL, 20 μL, 200 μL, 1000 μL Eppendorf®
	Research Plus; Eppendorf AG, Hamburg,
	Germany
Pipettenspitzen (normal + gestopft)	10 μL, 20 μL, 200 μL, 1000 μL TipOne®; Starlab
	GmbH, Hamburg, Germany
Reaktionsgefäß	Eppendorf [®] Safe-Lock Tubes 1,5 mL; Eppendorf
	AG; Hamburg, Germany
Spektralphotometer	NanoDrop 2000/2000c; Thermo Fisher
	Scientific, Waltham, MA, USA
Sterile Werkbank	KS 12 Herasafe [™] , Thermo Electron Corporation,
	Langenselbold, Germany
Thermo-Cycler	TProfessional TRIO 48; Biometra GmbH;
	Göttingen, Germany
UV-Tisch	UV-Transilluminator, 302 nm, Bachofer
	Laboratoriumsgeräte, Reutlingen, Germany
Vortexer	VWR [™] -Vortex-Schüttler, Typ VV3 S40;, VWR
	International GmbH; Darmstadt, Germany
NeubauerZählkammer	Assistent Neubauer Zählkammer,
	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG,
	Sondheim vor der Rhön, Germany
Zellkulturflaschen	TC-Zellkulturflasche, T75, Sarstedt AG & Co. KG,
	Nürnbrecht, Germany
Zellkulturpipetten	10 mL Arbeitsvolumen: Falcon [®] Serological Pipet,
	Corning Incorporated, New York, USA
	5 mL Arbeitsvolumen: Costar® Stripette®
	Serological Pipet; Corning Incorporated, New
	York, USA
Zentrifugen	Heraeus Megafuge 8R Zentrifuge;
	Thermo Electron LED GmbH; Osterode
	am Harz, Germany
	 Eppendorf[®] Centrifuge 5810 R;
	Eppendorf AG; Hamburg, Germany
	• 3K30; Sartorius AG; Göttingen Germany

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Geräte und der dazugehörigen Materialien

2.3.2 Verbrauchsmaterialien

2.3.2.1 Primer

Bei der Nested-PCR werden zwei verschiedene Primerpaare benötigt, welche als "erstes" bzw. "äußeres" und "zweites" bzw. "inneres" Primerpaar bezeichnet werden. Das äußere Primerpaar setzt von der zu amplifizierenden Region mehrere Basenpaare entfernt an. Das erste Primerpaar besteht aus dem *forward* Primer (*RG1-F*; 5′- CCCTATTCAGCACTTTGTCC – 3′) und dem *reverse* Primer (*RG1-R*; 5′- CAAACCACTGTGTCTCTGTC – 3′). *RG1-R* setzt an Basenpaar 4983-5002 des JCV-Archetyp-Referenzstrangs an, *RG1-F* an Basenpaar 419-439 (Tabelle 3). Ein Amplikon mit der Länge von 577 Basenpaaren wird erzeugt.

Das zweite, innere Primerpaar besteht aus dem forward Primer (Klon-F; 5'-AAAAAAACCGGTGCCTCGGCCTCCTGTATATA-3[']) und dem *reverse* Primer (*Klon-R*; 5′-TTTTTT<u>ACTAGT</u>GGCCAGCTGGTGACAAG – 3'). Klon-F setzt an Basenpaar 1-20 an, Klon-R an 251-267 an. Hier wird ein Amplikon von 267 Basenpaaren erzeugt. Das innere Primerpaar beinhaltet die später benötigten Restriktionsstellen der Restriktionsenzyme Agel und Spel (unterstrichener Bereich). Für die Sangersequenzierung des PCR-Produkts wird das zweite, innere Primerpaar verwendet; für die Sangersequenzierung des patientenindividuellen Klonierungsplasmids wird ebenfalls das innere Primerpaar verwandt, das in 3' -> 5'-Richtung bzw. in 5' -> 3'-Richtung die patientenindividuelle NCCR auf dem patientenindividuellen Plasmid abliest.

Die Primer der Firma biomers.net (Ulm, Germany) werden ausgehend von einer Stocklösung von 100 μ M mit nukleasefreiem Wasser (appliedbiosystems®by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; Life Technologies Corporation, Austin, TX, USA), welches auch für den Master Mix verwendet wurde, auf eine Arbeitslösung von 10 μ M verdünnt.

Name	Orientierung	Sequenz (5´3´)	Länge (bp)	Position
RG1-F	Forward	CCCTATTCAGCACTTTGTCC	20	419-439
RG1-R	Reverse	CAAACCACTGTGTCTCTGTC	20	4983-5002
Klon-F	Forward	AAAAAACCGGTGCCTCGGCC	32	1-20
		ТССТСТАТАТА		
Klon-R	reverse	TTTTTACTAGTGGCCAGCTG	29	251-267
		GTGACAAG		

Tabelle 3: Darstellung der verwendeten PCR-Primer mit ihren Eigenschaften für die Nested-PCR

2.3.2.2 Enzyme

Bei diesem Versuchsaufbau werden die Restriktionsenzyme Agel (Lot: 10045340) und Spel (Lot: 10046239; New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Germany) verwendet. Die inneren Primer Klon-R und Klon-F beinhalten die entsprechenden Schnittstellen dieser Restriktionsenzyme (Agel – ACCGGT; Spel – ACTAGT), sodass ein korrektes Schneiden der DNA-Fragmente gewährleistet Aktivität gewährleisten, ist. Um die optimale der Enzyme zu fügt man dem Restriktionsverdauprotokoll den CutSmart®Buffer (Lot: 10043912; New England Biolabs GmbH) hinzu.

Zusätzlich wird die *T4-DNA-Ligase* (Lot: 10037477; New England Biolabs GmbH) in Kombination mit dem *T4-DNA-Ligase Buffer(10X)* (Lot: 10050569; New England Biolabs GmbH) benutzt.

2.3.2.3 Medien

In mehreren Versuchsschritten wird mit *LB*-Medium (*lysogeny broth* bzw. *Luria-Bertani*-Medium) und einer Ampicillin-Stocklösung (100 mg/mL in ddH₂O; Lagerung bei -20° C) gearbeitet. LB-Medium ist ein nährreiches Medium (enthält Vitamine, Peptide etc.), das sehr häufig zur Kultivierung von Bakterien, insbesondere *Escherichia coli* (E. coli), eingesetzt wird. LB-Medium (Formulierung nach Lennox) besteht aus Trypton (10g/L), NaCl (5 g/L), Hefeextrakt (5 g/L) und dH₂O und wird nach Zusammenmischen der Ingredienzen autoklaviert. Ampicillin gehört zu der Antibiotikaklasse der Penicilline (ß-lactam-Antibiotika).

Beide werden meist in Kombination miteinander verwendet, um ein Ampicillin-haltiges LB-Medium "LB-Amp-Medium" (1 µL Ampicillin-Stocklösung auf 1 mL LB-Medium -> 100 µg/mL LB-Amp-Medium) herzustellen.

2.3.2.4 Zellkulturmedien

Zur Kultivierung der in diesem Versuch eingesetzten Zelllinien werden Produkte der Marken gibco (ThermoFischerScientific, Waltham, MA, USA) sowie Biochrom GmbH (Berlin, Germany) verwendet. Von Gibco kommen DMEM (1x) Dulbecco's Modified Eagle Medium, DPBS (1x) Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, 0,05% Trypsin-EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) (1x) und Pencillin-Streptomycin zum Einsatz, von Biochrom GmbH FBS Superior. Mit den genannten Ingredienzien wird sowohl Medium (DMEM) hergestellt, das 2% FBS (Fetal Bovine Serum) und 1% PenStrep enthält, als auch 10% FBS und 1% PenStrep. Darüberhinaus wird auch FBS-freies DMEM benutzt.

2.3.3 Klonierungsplasmid

Als Klonierungsplasmid wird das pTA-tdTOM-NCCR-eGFP-dual-Reporterplasmid (6.009 bp) verwendet, welches die beiden Fluorophore/Fluoreszenzproteine *tdTomato* und *eGFP* (*enhanced green fluorescent protein*) beinhaltet (siehe Abb. 2; freundlicherweise überlassen von M. Widera, University Hospital Frankfurt [238]). Die Fluorophore flankieren im Reporterplasmid die NCCR. Ihr Fluoreszenzexpressionslevel wird von der hineinklonierten NCCR gesteuert (sie dient als *origin of replication*) und ist dementsprechend ein Marker für die frühe Promotoraktivität (*tdTomato* – rotes Signal; Ableserahmen entgegengesetzt des Uhrzeigersinns) respektive die späte Promotoraktivität (*eGFP* – grünes Signal; Ableserahmen im Uhrzeigersinn). Auf dem Reporterplasmid ist *downstream* der beiden Fluoreszenzproteine ein SV40-Polyadenylationssignal, welches das effiziente und vergleichbare Ablesen der beiden Fluorophore garantiert. Zusätzlich ist ein Ampicillinresistenzgen auf dem Plasmid vorhanden, welches Zellen, wenn sie dieses Plasmid tragen, das Wachstum in Ampicillinhaltigem Medium erlaubt (Kontaminationsschutz vor Ampicillin-sensiblen Erregern).



Abb. 2: Darstellung des pTA-tdTOM-NCCR-eGFP-dual-Reporterplasmid [238]. Dieses wird als Klonierungsplasmid verwendet und beinhaltet die Fluorophore/Fluoreszenzproteine tdTomato und eGFP. Die NCCR wird durch die beiden Restriktionsstellen der Restriktionsenzyme Agel und Spel flankiert, an denen die Fluorophore direkt anschließen. Darüber hinaus findet man ein Ampicillinresistenzgen auf dem Plasmid; polyA-signal = SV40-Polyadenylationssignal, NCCR = noncoding control region

2.3.4 Zelllinien

In diesem Versuchsaufbau werden HEK293T-Zellen benötigt. HEK293T sind embryonale Nierenzellen, die konstant das T-Antigen exprimieren. Sie werden bei 37°C im Brutschrank kultiviert und nach einer Wachstumsdauer von ca. 2-3 Tagen im Verhältnis 1:10 gesplittet und in einer neuen Zellkulturflasche mit frischem Medium versorgt. Der Vorgang des Zellsplittens läuft wie folgt ab: man überprüft die Zelldichte unter dem Mikroskop und splittet die Zellen bei ca. 90% Konfluenz. Nach Absaugen des alten Mediums "wäscht" man die Zellen mit DPBS und gibt anschließend Trypsin zu. Nach kurzer Einwirkzeit nimmt man dieses wieder ab und die Zellen beginnen sich von dem Flaschenboden zu lösen. Anschließend nimmt man die Zellen in Medium wieder auf und überführt 1/10 der Zellen in frisches Medium.

2.4 Methoden

2.4.1 Erklärung des Versuchsaufbaus

Bei dieser Arbeit soll sowohl eine molekulare als auch eine funktionale Analyse der *Non-Coding-Control-Region* (NCCR) erfolgen. Hierfür werden Liquor- und Serumproben von PML-Patienten, bei denen man JC-Virus-DNA in dem jeweiligen Material (Liquor oder Serum) nachweisen konnte, als Grundlage genommen. Nach Isolierung der Virus-DNA amplifiziert man spezifisch die NCCR in jeder Probe durch eine Nested-PCR. Nach Aufreinigung des PCR-Produkts analysiert bzw. nutzt man dieses auf drei Weisen:

A) Man kloniert die Wildtyp-NCCR, die aus dem Patientenmaterial amplifiziert wurde, in ein bidirektionales Reporterplasmid (siehe unter 2.3.3.). Hierfür wird die NCCR mit zwei Restriktionsenzymen behandelt, die kohäsive bzw. sticky Enden am 5´bzw. 3´-Ende erzeugen. Diese werden für die komplementäre Ligation mit den sticky ends des Reporterplasmids benötigt. Nach der Ligation wird das entstandene Plasmid in kompetente Escherichia coli transfiziert, die man auf einer mit Ampicillin-beschichteten LB-Agar-Platte ausstreicht. Durch auf dem Reporterplasmid kodierte Ampicillin-Resistenzgen das wachsen nur Bakterien/Erreger, die resistent gegenüber Ampicillin sind. Nach einer Inkubationszeit von ca. 12-14 h selektiert man E. coli-Kolonien, überimpft sie in frisches LB-Ampicillin-Medium und lässt sie erneut wachsen. Anschließend reinigt man die in den Bakterien enthaltende Plasmid-DNA über einen Mini-Präp auf und überprüft mittels Restriktionsverdau, ob die NCCR in dem Plasmid enthalten ist. Die "positiven" Kolonien werden nach Überimpfung in frisches LB-Ampicillin-Medium mithilfe des Maxi-Präps hochaufgereinigt. Die erzeugten patienten- und materialspezifischen Plasmide werden nun in embryonale Nierenzellen (HEK293T) transfiziert, welche nach einer Inkubationszeit von 48h mithilfe der FACS analysiert werden. Auf dem Reporterplasmid sind zwei Fluorophore, tdTomato und eGFP, kodiert. Die Wildtyp-NCCR reguliert die Aktivität bzw. Fluoreszenzintensität der beiden Fluorophore, die wiederum die frühe bzw. späte Promotoraktivität des JC-Virus darstellen. Somit ist es möglich, die unterschiedlichen Aktivitätslevel der unterschiedlichen NCCR zu detektieren und zu analysieren.

- B) Man möchte mittels Sanger-Sequenzierung die Basensequenz der patientenindividuellen Wildtyp-NCCR ermitteln. Hierbei achtet man auf *Rearrangements*, die im Vergleich zum JCV-Archetype aufgetreten sind. Diese *Rearrangements* setzt man in Bezug zu den unterschiedlichen Aktivitätsleveln bzw. den Ergebnissen aus Versuch A).
- C) Sowohl im Liquor als auch im Serum liegen meist neben der dominierenden Major-Variante noch weitere Subvarianten/Minorvarianten der NCCR vor. Diese möchte man mittels Next-Generation-Sequencing bzw. Tiefensequenzierung ermitteln und ebenfalls hinsichtlich der Basensequenz und Rearrangements untersuchen. Anschließend sollen diese in Bezug zur korrespondierenden Major-Variante gesetzt werden.

2.4.2 Nested-PCR

Nach der Aufreinigung der Virus-DNA aus der Originalprobe soll spezifisch die NCCR amplifiziert werden. Dies soll mithilfe des Verfahrens der Nested-PCR erfolgen.

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ist ein Verfahren zum Amplifizieren von DNA. Hierbei bindet ein Primer an den zu amplifizierenden Template-DNA-Strang und stellt damit das freie 3'OH-Ende für die DNA-Polymerase, die die zum Template-Strang komplementären Nukleotide einfügt, zur Verfügung. Das Verfahren gliedert sich in 3 aufeinander folgende Schritte, die je nach PCR-Protokoll unterschiedlich häufig wiederholt werden – Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation. Bei der Denaturierung trennt man den doppelsträngigen DNA-Strang auf, sodass im nächsten Schritt die Primer an der bindungsspezifischen Stelle binden können. In der Elongationsphase fügt die DNA-Polymerase die komplementären Nukleotide hinzu und erzeugt somit wieder einen DNA-Doppelstrang. Aus einem "Mutterstrang" entstehen bei einem PCR-Ablauf zwei "Tochterstränge", die bei der nächsten Denaturierungsphase wieder getrennt werden und als DNA-Matrize fungieren Bei der Nested-PCR sind zwei PCR-Zyklen mit unterschiedlichen Primerpaaren zeitlich können. hintereinandergeschaltet. Dieses Verfahren eignet sich besonders gut, wenn wenig DNA als Matrize vorhanden ist. Die Nested-PCR soll sowohl die Sensitivität um den Faktor 10² - 10³ als auch die Spezifität erhöhen, da für den zweiten PCR-Zyklus nur das bereits amplifizierte Teilstück der Ursprungsprobe als Matrize dienen kann. Das erste Primerpaar bindet mehrere Basenpaare von der zu vervielfältigenden Region entfernt, das zweite Primerpaar *downstream* davon und flankiert im Optimalfall die Region von Interesse.

Das hier verwendete PCR-Protokoll wurde gemäß untenstehender Tabelle durchgeführt. Bei dem ersten PCR-Zyklus beträgt die Primer *Annealing*-Temperatur 60° C (siehe Tabelle 4), beim zweiten PCR-Zyklus 62° C (siehe Tabelle 5). Die Temperaturen werden entsprechend der Primerlänge bzw.-sequenz festgelegt.

Wiederholungen	Dauer	Temperatur
1	30 s	98°C
	10 s	98°C
35	30 s	60°C
	50 s	72°C
1	5 min	72°C
1	∞	4°C

Tabelle 4: PCR-Protokoll des 1. Zyklus. In der linken Spalte wird angegeben, wie häufig dieser Teilschritt des PCR-Verfahrens wiederholt wird. Das Zeichen ∞ bedeutet, dass die Probe so lange gekühlt wird, bis man sie aus dem ThermoCycler herausnimmt und weiter verfährt.

Wiederholungen	Dauer	Temperatur
1	30 s	98°C
	10 s	98°C
35	30 s	62°C
	50 s	72°C
1	5	72°C
	min	
1	∞	4°C

Tabelle 5: PCR-Protokoll des 2. Zyklus: In der linken Spalte wird angegeben, wie häufig dieser Teilschritt des PCR-Verfahrens wiederholt wird. Das Zeichen ∞ bedeutet, dass die Probe so lange gekühlt wird, bis man sie aus dem ThermoCycler herausnimmt und weiter verfährt.

Der für das PCR-Protokoll benötigte Master Mix wird im speziell abgetrennten und isolierten Master-Mix-Raum vorbereitet. Hierfür wird der Phusion [®]High-Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs[®]Inc., Ipswich, MA, USA) verwendet. Ein 45 µl Ansatz wird vorbereitet und mit jeweils 5 µl isolierter Patienten-JCV-DNA (aus Liquor bzw. Serum) auf 50 µl unter der Werkbank für infektiöse Materialien aufgefüllt. Die jeweiligen Mengenangaben sind in der untenstehenden Tabelle 6 und Tabelle 7 für den 1. sowie 2. PCR-Zyklus aufgelistet. Bei jedem PCR-Zyklus wird sowohl eine Positivund Negativkontrolle mitgeführt.

Komponente	Volumen/Reaktion
	(µL)
Phusion High-Fidelity	25
Master Mix	
RG1-F (10 µM)	2,5
RG1-R (10µM)	2,5
Nukleasefreies	15
Wasser	
Isolierte Patienten-	5
JCV-DNA	

Tabelle 6: 50 µL Master-Mix-Ansatz für 1. PCR-Zyklus

Komponente	Volumen/Reaktion	
	(μL)	
Phusion High-Fidelity	25	
Master Mix		
Klon-F (10 μM)	2,5	
Klon-R (10µM)	2,5	
Nukleasefreies Wasser	15	
Produkt aus 1. PCR-	5	
Runde		

Tabelle 7: 50 µL Master-Mix-Ansatz für 2. PCR-Zyklus

Anschließend werden die positiven PCR-Produkte selektiert und es wird überprüft, ob das gewünschte PCR-Produkt entstanden ist. Hierfür macht man sich das Prinzip der Agarose- Gelelektrophorese zunutze. Bei dieser ist es möglich, DNA (bzw. RNA) sichtbar zu machen, anhand ihrer Größe aufzutrennen und mit DNA-Strängen bekannter Größe (einer "DNA-Leiter") zu vergleichen. Durch die negative Ladung der Phosphatreste der DNA wandern diese beim Anlegen des Stroms zur Anode – größere Fragmente laufen langsamer als kleine. Die Proben werden mit einer interkalierenden Substanz (Ethidiumbromid) versetzt, die sich an die DNA anlagert und somit diese bei UV-Bestrahlung sichtbar werden lässt.

Nach Beendigung des 2. PCR-Zyklus werden 10 µL des PCR-Produkts mit 2 µL Auftragspuffer (Gel Loading Dye, Purple (6X), New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Germany) gemischt und gemeinsam mit der Positiv- und Negativkontrolle auf ein 1 % analytisches Gel aufgetragen. Dieses wird aus 0,5 g Agarose (Biozym LE Agarose; Biozym Biotech Trading GmbH, Wien, Austria), 50 ml Tris-Borat-EDTA-Puffer (SIGMA-ALDRICH, Co.; St. Louis, USA) und 2 Tropfen Ethidiumbromid hergestellt. Die DNA-Leiter (HyperLadder[™] 1 kb – 500 lanes; Bioline; BioCat GmbHb, Heidelberg, Germany) wird zur Größenbestimmung des Fragments aufgetragen. Nachdem das Gel bei 75 mA ca. 20 Minuten gelaufen ist, werden die aufgetrennten Produkte mittels kurzwelligem UV-Licht sichtbar gemacht. Man erwartet ein klar sichtbares Produkt mit einer Länge von ca. 300 bp.

Die Aufreinigung der positiven PCR-Produkte erfolgt nach Herstellerprotokoll. Diese wird mit dem QIAquick [®]PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) durchgeführt. 200 μ L des Puffers PB (*Binding Buffer;* Guanindin-Hydrochlorid sowie Isoproponal; pH \leq 7,5) werden mit den

verbliebenen 40 µL PCR-Produkt gemischt (Verhältnis 5:1). Der Bindepuffer ermöglicht die suffiziente Bindung der einzel- bzw. doppelsträngigen DNA an die Spin-Säulenmembran. Die Mischung wird auf die QIAquick-Säule gegeben, anschließend wird diese ca. 60 s bei 13.000 rpm (*revolutions per minute*) zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Es wird mit 750 µL Puffer PE (*Wash Buffer*; 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 sowie 80% Ethanol) gewaschen und wieder für ca. 60 s bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und es wird ohne weitere Zugabe von Puffer PE erneut zentrifugiert. Die QIAquick-Säule wird auf ein frisches 1,5 mL Eppendorf®-Hütchen gesteckt. Die DNA wird durch Zugabe von 30 µL Puffer EB (*Elution Buffer*; 10 mM Tris-HCl pH 8,5) und erneute Zentrifugation (60 s; 13.000 rpm) eluiert. Im letzten Schritt wird die Konzentration der aufgereinigten PCR-Produkte sowie deren Reinheitsgrad (260/280-Wert) photometrisch bestimmt.

2.4.3 Klonierungsablauf

2.4.3.1 Restriktionsverdau

Nach der Aufreinigung des PCR-Produkts wird dieses mit den Restriktionsenzymen Agel und Spel "verdaut". Die inneren Primer Klon-R und Klon-F beinhalten die entsprechenden Schnittstellen dieser Restriktionsenzyme (Agel – A<u>CCGG</u>T; Spel – A<u>CTAG</u>T), sodass ein korrektes Schneiden der DNA-Fragmente gewährleistet ist. Die Restriktionsenzyme erzeugen kohäsive bzw. *sticky* Enden, die komplementär zu den kohäsiven Enden des Klonierungsplasmids sind. Für den Restriktionsverdau vermischt man das PCR-Produkt mit den beiden Restriktionsenzymen sowie dem *CutSmart®Buffer*, um die optimale Aktivität der Enzyme zu gewährleisten. Das Restriktionsverdauprotokoll ist unten in Tabelle 8 gezeigt. Nach dem Zusammenmischen des 20 µL Ansatzes wird dieser 1 Stunde bei 37° C inkubiert.

Komponente	Volumen/ Reaktion)
	in µL
Aufgereinigtes PCR-	16
Produkt	
CutSmart [®] Buffer	2
Agel	1
Spel	1

Tabelle 8: 20 µL Ansatz für Restriktionsverdau

Nach dem Restriktionsverdau möchte man nur mit der verdauten NCCR weiterarbeiten und nichtgewünschte Fragmente wie z.B. Primerdimere entfernen. Hierfür nutzt man das Verfahren des präparativen Agarosegels, in dem man – ähnlich zum analytischen Agarosegel – die DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese auftrennt und anschließend die gewünschte Bande aus dem *Low-Melt*-Agarose-Gel ausschneidet und aufreinigt. Nach der Inkubation wird der gesamte Restriktionsansatz mit 4 µL Auftragspuffer (Gel Loading Dye, New England Biolabs GmbH) versetzt. Währenddessen wird das 1% präparative Agarosegel mit 0,5 g Low-Melt-Agarose (Biozym Sieve GP Agarose; Biozym Biotech Trading GmbH, Wien, Austria), 50 ml TBE-EDTA und 2 Tropfen Ethidiumbromid hergestellt. Die DNA-Leiter (HyperLadder[™] 1 kb – 500 lanes) läuft zur korrekten Zuordnung des Fragments mit. Nachdem das Gel ca. 35 Minuten bei 40 mA gelaufen ist, macht man dieses mit langwelligem UV-Licht (365 nm) sichtbar und schneidet es unter Verwendung eines zuvor gereinigten Skalpells aus.

2.4.3.2 Ligation der NCCR mit dem Klonierungsplasmid

Im folgenden Verlauf sollen die patientenspezifischen NCC-Regionen mit dem bidirektionalen Reporterplasmid ligiert werden. Hierfür wird das pTA-tdTOM-NCCR-eGFP-dual – Reporterplasmid (6.009 bp) verwendet, welches die beiden Fluorophore/Fluoreszenzproteine *tdTomato* und *eGFP* beinhaltet.

Um das gewünschte pTA-tdTOM-NCCR-eGFP-dual – Reporterplasmid herzustellen, muss dieses durch Verdau mit *Agel* und *Spel* aus dem Plasmid pEX-K4 2-LTR-CD3 [238, 239] gewonnen und, wie bereits beschrieben, auf 1%-Low-Melt-Agarose-Gel aufgetragen und ausgeschnitten werden.

Für die Ligation werden die im präparativen Gel ausgeschnittenen patientenindividuellen NCC-Regionen (im Folgenden als *"Insert"* betitelt) sowie das Reporterplasmid (im Folgenden als *"Vektor-Backbone"* betitelt) für 5 min bei 68 °C inkubiert, um die Agarose zum Schmelzen zu bringen. Gleichzeitig wird der Ligationsansatz auf Eis vorbereitet, der sich wie folgt zusammensetzt (siehe Tabelle 9). Nach der Inkubation des Vektors bzw. des *Backbones* werden die u.g. Mengen zu dem Ligationsansatz vorsichtig dazugegeben. Der 20 µL Ligationsansatz wird daraufhin 30 min bei 37 °C inkubiert.

Komponente	Volumen/Reaktion (in µL)
NCCR-Insert	4
Vektor-Backbone	2
T4-Ligase	1
T4 DNA Ligase Puffer	2
(10X)	
Nukleasefreies	11
Wasser	

Tabelle 9: 20 μL Ansatz für Ligation der NCCR ("Vektor") mit dem Reporterplasmid ("Vektor-Backbone")

2.4.3.3 Transfektion des Ligationsansatzes in kompetente E.coli

Der Ligationsansatz wird in kompetente *E. coli* transfiziert. Hierzu wird die *"Heat-Shock"*-Methode verwandt. Durch das schnelle, kurze Erhitzen der Bakterien werden Poren in deren Membran gebildet, die das Eindringen der Plasmid-DNA ermöglichen.

Zuerst werden die kompetenten *E. coli* (100 μ L) aus dem -80 °C-Vorrat genommen und auf Eis langsam aufgetaut. Danach pipettiert man langsam 5 μ L des patientenspezifischen Ligationsansatzes zu den Bakterien und lässt das Plasmid-DNA-Bakteriengemisch für weitere 15 Minuten auf Eis stehen. Nach einer kurzen Inkubation (ca. 90 s) bei 42 °C gibt man die Zellen für weitere 90 s wieder auf Eis. Anschließend überführt man die Suspension in ein Glasröhrchen mit Medium. Dieses Medium setzt sich aus LB-Medium, 1 M Magnesiumchlorid sowie 1 M Glucose-Lösung zusammen. Das
Komponente	Volumen/Ansatz
LB-Medium	1 mL
1 M MgCl ₂	10 µL
1 M Glucose	20 µL

Mischungsverhältnis ist in der untenstehenden Tabelle 10 aufgeführt. Von den 1030 µL Transfektionsmedium werden je 800 µL pro Transfektion verwendet.

Tabelle 10: Ansatz für das Transfektionsmedium

Nach dem Überführen des Bakterien-DNA-Gemischs in das mit Transfektionsmedium gefüllte Glasröhrchen wird dieses schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden 0,3 mL des Transfektionsansatzes auf einen Ampicillin-enthaltenden LB-Agarnährboden ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Ampicillin-Beschichtung ermöglicht nur Ampicillin-resistenten Bakterien bzw. Erregern das Wachstum. Diese Ampicillin-Resistenz ist auf dem Backbone der Plasmid-DNA kodiert. Nach dem Ausstreichen wird die Agarplatte umgedreht, um ein mögliches Herabtropfen von Kondensationswasser und das demzufolge eingeschränkte Wachstum der Bakterien zu verhindern.

2.4.3.4 Animpfen der gewachsenen Kolonien

Am Folgetag wird geprüft, ob auf der ausgestrichenen LB-Ampicillin-Agarplatte Einzelkolonien gewachsen sind, die auf das Hervorgehen aus einem einzelnen Bakterium sowie die genetische Identität der Bakterien innerhalb dieser Einzelkolonie hindeuten. 10 Einzelkolonien werden mittels steriler Pipetten "gepickt" und in Glasröhrchen mit LB-Medium und Ampicillin (3 mL LB-Medium + 3 µL Ampicillin) überführt. Diese werden über Nacht im Drehschüttler inkubiert.

2.4.3.5 Analytische Plasmid-DNA-Aufreinigung und Restriktionsverdau

Am Folgetag soll überprüft werden, ob das gewünschte Plasmid in den Bakterien enthalten ist. Hierfür extrahiert man es aus den *E. coli*, reinigt es auf (alkalische Lyse; Mini-Präp) und führt anschließend einen Restriktionsverdau mit *Agel* und *Spel* durch. Im analytischen Gel kann kontrolliert werden, ob sowohl das Klonierungsplasmid als auch die ausgeschnittene NCCR enthalten ist. Erst nach dieser Überprüfung kann nach erneuter Inkubation dieses Bakterienstammes in frischem Medium (mit Ampicillin) eine präparative Plasmid-DNA-Aufreinigung erfolgen.

Die nachfolgend verwendeten Puffer sind von der Marke Qiagen GmbH (Hilden, Germany) und Teil des Qiagen®Plasmid Maxi Kit. Nach der Inkubation wird ca. 1,5 mL der Bakteriensuspension in ein Eppendorf®-Hütchen gefüllt und für 60 s bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die Bakterien sammeln sich am Boden des Hütchens, der Überstand kann abgenommen werden. Man gibt 300 µL gekühlten Puffer P1 (*resuspension buffer;* 50 µM Tris-Cl, pH 8, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A) hinzu und vortext, bis das Pellet vollständig gelöst ist. Die RNaseA soll störende bzw. unerwünschte RNA-Fragmente abbauen. Anschließend werden 300 µL Puffer P2 (*lysis buffer;* 1% Natriumdodecylsulfat, 200 mM Natriumhydroxid) appliziert, welchen man 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren lässt, um die Zellen zu lysieren. Um die Lyse zu stoppen und den pH-Wert in den alkalischen Bereich zu verschieben, werden 300 µL gekühlter Puffer P3 (*neutralization buffer;* 3 M CH₃COOK, pH 5,5)

hinzugegeben. Das Gemisch wird für 15 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Währenddessen wird 640 μ L Isopropranol in ein frisches Eppendorf®-Hütchen gegeben, in das der Überstand der zentrifugierten Probe, welcher die Plasmid-DNA enthält, überführt wird. Nach erneuter Zentrifugation (15 min; 13.000 rpm), in der die DNA durch das Isopropranol gefällt/präzipitiert wird, nimmt man den Überstand ab und gibt 100 μ L 70% Ethanol hinzu, wodurch die Plasmid-DNA gewaschen werden soll. Man saugt erneut den Überstand ab und nimmt das Pellet in 20 μ L TE-Puffer (*tris-EDTA-buffer*;10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA-Na₂) auf.

Nun folgt der Restriktionsverdau, der die NCCR aus dem Klonierungsplasmid herausschneiden soll. Hierfür bereitet man folgenden Restriktionsansatz (siehe Tabelle 11) auf Eis vor, der nach Zusammenmischen für 1 h bei 37° C inkubiert wird:

Komponente	Volumen/Reaktion
	(in µL)
Agel	0,5
Spel	0,5
CutSmart [®] Buffer	1
Nukleasefreies	3
Wasser	
Aufgereinigte Mini-	5
Präp-Probe	

Tabelle 11: 10 µL Restriktionsansatz für aufgereinigte Mini-Präp-Probe

Anschließend trägt man die Proben auf das analytische Gel (s.o.) und selektiert die Bakterienstämme, in der das Klonierungsplasmid und die ausgeschnittene NCCR enthalten sind.

2.4.3.6 Präparative Plasmid-DNA-Aufreinigung

Nachdem der Bakterienklon bzw. -stamm selektiert wird, der das Klonierungsplasmid mit der patientenindividuellen Wildtyp-NCCR enthält, wird die Plasmid-DNA mittels "Maxi-Präp" (alkalische Lyse) in großen Mengen aufgereinigt. Hierfür überführt man 100 µL der selektierten Mini-Präp-Kultur in 150 mL LB-Medium (welches 150 µL Ampicillin-Stocklösung enthält) und lässt dies schüttelnd (300 rpm) über Nacht bei 37° C inkubieren.

Im weiteren Verlauf nutzt man das Qiagen®Plasmid Maxi Kit und folgt dabei exakt dem Herstellerprotokoll. Die Inhaltsstoffe der Puffer P1, P2, P3 und TE sowie deren Wirkung sind bereits erklärt worden.

Nach der Inkubationszeit von ca. 12-16 Stunden werden die Bakterien abzentrifugiert (6.000g; 15 min; 4° C), der flüssige Überstand kann abgenommen werden. Anschließend resuspendiert man das entstandene Bakterienpellet mit 10 mL gekühlten Puffer P1 und lysiert die Zellen mit 10 mL Puffer P2. Nach 5-minütiger Einwirkzeit bei Raumtemperatur wird die Lyse durch 10 mL gekühlten Puffer P3 gestoppt. Es folgt eine erneute Zentrifugation (20.000g; 30 min; 4° C). Es bilden sich zwei Phasen – eine flüssige, durchsichtige Phase (Überstand), die die Plasmid-DNA enthält, und das weiß-flockige Präzipitat, welches man durch Filtration von dem Überstand trennen möchte. Anschließend wird eine Qiagen®-Filtrationssäule verwendet, die zunächst mit 10 mL Puffer QBT (*equilibration buffer;* 750 mM NaCl, 50 mM MOPS, pH 7, 15%-Isopropanol(v/v), 0,15% Triton®X-100(v/v)) äquilibriert

werden muss. Anschließend gibt man den klaren, filtrierten Überstand auf die Säule und wartet, bis die Flüssigkeit der Schwerkraft folgend durch die Säule geflossen ist. Die Qiagen®-Säule hält dabei die Plasmid-DNA zurück. Man wäscht die Qiagen®-Säule zweimal mit je 30 mL Puffer QC (*wash buffer*;1 M NaCl, 50 mM MOPS, pH 7, 15% Isopropanol (v/v)) und eluiert danach die Plasmid-DNA mit 15 mL Puffer QF (*elution buffer*; 1,25 M NaCl, 50 mM Tris-Cl, pH 8,5, 15% Isopropanol (v/v)) in ein frisches Reaktionsgefäß. Die Präzipitation der DNA erfolgt durch 10,5 mL Isopropanol und anschließende Zentrifugation (15.000 g; 30 min; 4° C). Ein weißes Pellet und ein klarer Überstand entstehen, den Überstand nimmt man durch vorsichtiges Dekantieren ab. Die Plasmid-DNA wird mit 5 mL 70%-Ethanol gewaschen, es folgt eine erneute Zentrifugation (15.000 g; 10 min). Der Überstand wird wieder vorsichtig abgegossen und das Falcon-Röhrchen mit dem Pellet zum Lufttrocknen kopfüber gestellt. Im folgenden Schritt wird es in 150 μL TE-Puffer aufgenommen, die Konzentration und der Reinheitsgrad (260/280-Wert) werden photometrisch bestimmt.

An dieser Stelle muss überprüft werden, ob die gewünschte Patienten-Wildtyp-NCCR in das Plasmid hineinkloniert wurde. Da Mutationen spontan entstehen können, ist der Abgleich zwischen der NCCR des jeweiligen Patienten-Klonierungsplasmids und der in der Nested-PCR entstandenen und durch die Methode nach Sanger sequenzierten Patienten-NCCR (siehe Versuchsablauf Teil B) essenziell. Nur wenn beide Sequenzen kongruent zueinander sind, kann mit dem jeweiligen Plasmid weitergearbeitet werden. Die Sequenzierungsmethode und der Sequenzierungsablauf sind unter 2.4.5. näher erläutert.

2.4.3.7 Transfektion des Klonierungsplasmids in HEK293T-Zellen

Am Tag vor der Transfektion müssen die HEK293T-Zellen in *6well*-Platten ausgesät werden. Hierfür wäscht und trypsiniert man die Zellen (s.o.) und nimmt sie in frischem 10%-FBS-Medium auf. Die Zelldichte wird nun mittels Neubauer-Zählkammer ermittelt. Man sät ca. 500.000 Zellen pro *well*-Platte aus und lässt sie bis zum Folgetag inkubieren. 1 h vor Transfektion wechselt man das Medium von 10%FBS auf 2%FBS.

Die Transfektion erfolgt mit *FuGENE*®6 Transfection Reagent (Lot: 0000393736; Promega Corporation; Madison, USA) bei einem *FuGENE*®6 zu DNA-Verhältnis von 2:1. Zunächst gibt man 95 µL FBS-freies Medium (RT) in ein Reaktionsgefäß, danach 5 µL *FuGENE*®6 (RT) und lässt das Gemisch 5 min bei Raumtemperatur inkubieren. Anschließend überführt man dieses in ein Reaktionsgefäß, in das bereits 2,5 µg patienten- und materialspezifische Plasmid-DNA hinein pipettiert wurde. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur überführt man das *FuGENE*®6-DNA-Medium-Gemisch tropfenweise auf die HEK293T-Zellen in der Platte und platziert diese in den Brutschrank zur Inkubation für 48 Stunden. Nach diesen 48 h wird die Fluoreszenz der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop (siehe Abb. 3 & Abb. 4) überprüft und ihr Aktivitätslevel mittels FACS gemessen.



Abb. 3: Darstellung der fluoreszierenden HEK293T-Zellen durch Fluorophor *eGFP*. 48h nach Transfektion der Plasmid-DNA wird unter dem Fluoreszenzmikroskop die (grüne) Fluoreszenz der Zellen überpüft, bevor diese weiter durchflusszytometrisch untersucht werden. Die grüne Fluoreszenz spricht für eine erfolgreiche Transfektion des Plasmids mit seinen beiden Fluorophoren *tdTomato* (rot) und *eGFP* (grün).



Abb. 4: Darstellung der fluoreszierenden HEK293T-Zellen durch Fluorophor tdTomato. 48h nach Transfektion der Plasmid-DNA wird unter dem Fluoreszenzmikroskop die (rote) Fluoreszenz der Zellen überprüft, bevor diese weiter durchflusszytometrisch untersucht werden. Die rote Fluoreszenz spricht für eine erfolgreiche Transfektion des Plasmids mit seinen beiden Fluorophoren tdTomato (rot) und eGFP (grün).

2.4.4 Durchflusszytometrische Auswertung

2.4.4.1 Ablauf der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Untersuchung von Einzelzellsuspensionen durch spezifisches Laserlicht bzw. einen Laserstrahl. In diesem Verfahren werden Daten über jede zu

untersuchende Zelle einzeln bzw. ihre molekularen und physikalischen Eigenschaften gesammelt. Dies gelingt dadurch, dass die Zellen einzeln wie an einer Perlschnur durch hydrodynamische Fokussierung durch die s.g. flow cell (ein ultraenger Kanal einer hochpräzisen Küvette) fließen und dabei mit einem Laserstrahl geeigneter Wellenlänge im rechten Winkel bestrahlt werden. Durch die Bestrahlung der Zelle mit dem Laser entsteht Streulicht durch Beugung und Brechung des Lichts bzw. ein Fluoreszenzsignal bei Verwendung von Fluorophoren/Farbstoffen, das von einem Detektor registriert und ausgewertet wird. Diese Daten helfen - insbesondere in einer Suspension mit verschiedenen Zelltypen - bei der Differenzierung dieser unterschiedlichen Zellsorten und deren spezifischer Eigenschaften. Beim Streulicht unterscheidet man das Vorwärtsstreulicht (FSC = forward scatter) und das Seitwärtsstreulicht (SSC = side scatter) - beide werden determiniert durch Größe, Oberfläche und Granularität der Zelle bzw. des Zellkerns. Das Streulicht wird durch Änderung des Lichtstrahls erzeugt, nicht durch Änderung der Wellenlänge. Gleichzeitig kann man mit Laserlicht Farbstoffe zur Licht- bzw. Fluoreszenzemission anregen - diese Farbstoffe können intrazellulär liegen (wie bei dem hiesigen Untersuchungsansatz in Form eines bidirektionalen Reporterplasmids mit zwei Fluorophoren) oder als Antikörper auf spezifischen Oberflächenantigenen binden. Diese Farbstoffe absorbieren das Licht in einem spezifischen bzw. charakteristischen Wellenlängenbereich (Absorptionsspektrum) und heben damit Elektronen auf ein höheres Energieniveau. Beim Zurückkehren der Elektronen auf ihr energetisches Grundniveau emittieren sie Photonen, die als zu messende Fluoreszenz (in einem spezifischen Emissionsspektrum) detektiert werden kann.

Die erfassten Daten bzw. Eigenschaften der Zellen werden im Anschluss mit einer gerätespezifischen Software ausgewertet.

2.4.4.2 Präparation der HEK293T-Zellen für die durchflusszytometrische Auswertung

48 Stunden nach Transfektion werden die Zellen, deren Fluoreszenz bzw. Fluoreszenzaktivitätslevel mittels Durchflusszytometrie bzw. FACS untersucht und analysiert werden, für diese Messung speziell vorbereitet.

Zunächst löst und spült man vorsichtig die Zellen mittels Resuspension des Mediums in den 6*well*-Platten ab und überführt sie in beschriftete FACS-*Tubes*. Anschließend werden die HEK293T-Zellen abzentrifugiert (1800 rpm; 3 min) und das Medium über dem Zell-Pellet wird abgenommen. Die Zellen werden mit 1 mL PBS aufgenommen und gewaschen, danach zentrifugiert man sie erneut ab (1800 rpm; 3 min) und nimmt das PBS wieder ab. Diesen Waschschritt wiederholt man in gleicher Weise ein zweites Mal.

Im Anschluss erfolgt die Färbung mit einem Vitalitätsfarbstoff, der tote Zellen vor dem Fixierungsverfahren permanent markiert. Bei der durchflusszytometrischen Untersuchung kann dieser Farbstoff mit einem Laserstrahl spezifischer Wellenlänge angeregt werden und so dazu dienen, lebendige von toten Zellen zu differenzieren – dies ist insbesondere bei der Untersuchung von intrazellulären Strukturen notwendig, da tote Zellen Ergebnisse stark verzerren können.

Für die Färbung mit dem Vitalitätsfarbstoff, dem s.g. *Viability Dye*, bereitet man ein Gemisch aus PBS und dem Farbstoff vor. 1 µL *Fixable Viability Dye eFluor* (**R** *780* (Lagerung bei -70° C) wird gründlich in 1 mL PBS gemischt. Jeweils 100 µL des PBS/*Viability Dye*-Gemischs werden in jedes FACS-*Tube* hinein pipettiert und kurz mit dem Zellpellet gevortext. Es folgt eine 15-minütige Inkubation im Kühlschrank bei 4° C.

Die Zellen werden dann erneut mit 1 mL PBS gewaschen und der Überstand wird nach Zentrifugation (1800 rpm; 3 min) abgenommen. Das Zell-Pellet wird in der verbliebenen Restflüssigkeit gelöst bzw. kurz angevortext, sodass eine Zell-PBS-Suspension entsteht, die nun mittels FACS weiter untersucht werden kann.

2.4.4.3 Kompensation und Gating für die durchflusszytometrische Auswertung

Bei der durchflusszytometrischen Auswertung der mittels verschiedener Farbstoffe fluoreszierenden Zellen muss die spektrale Überlappung der Farbstoffe bzw. die Überlappung der jeweiligen Emissionsspektren berücksichtigt werden. Ein Fluoreszenzfarbstoff sendet nicht nur Lichtsignale in den gewünschten Kanal (Wellenlängenemissionsbereich in nm) bzw. Detektor, sondern meist auch (schwächere) Signale in andere Kanäle, die konsekutiv die Ergebnisse verzerren können. Dies ist vor allem bei Mehrfarbenanalysen wie im vorliegenden Experiment ein Problem, da man nicht exakt festlegen kann, welcher Farbstoff das entsprechende Signal im Kanal bzw. auf dem Detektor verursacht hat. Um dieses Problem zu minimieren und die Streuung der Farbstoffe in andere (nicht erwünschte) Kanäle zu korrigieren, bedient man sich der Methode der Kompensation. Diese sollte weder zu stark noch zu schwach sein, da sonst Ergebnisse verfälscht werden bzw. verloren gehen. Im hier durchgeführten Experiment muss z.B. das Fluoreszenzsignal, das *eGFP* in den Hauptdetektorkanal von *tdTomato* aussendet, herausgerechnet werden, damit man nur das Fluoreszenzsignal von *tdTomato* in dem vorgesehenen Kanal erfasst.

Die Kompensation ist notwendig für die beiden Fluorophore *eGFP* und *tdTomato* sowie für den Vitalitätsfarbstoff *eFluor* (**R** *780*.

Für die Kompensation nutzt man Zellsuspensionen, die, nicht wie die zu untersuchende Zellpopulation alle drei Farbstoffe gleichzeitig, sondern lediglich einen der drei Farbstoffe einzeln enthält und somit ein Fluoreszenzsignal aussendet. Hierfür benötigt man also zum einen HEK293T-Zellen, die *eGFP* enthalten - zum anderen braucht man HEK293T-Zellen, die *tdTomato* als Fluorophor aufweisen. Zudem verwendet man HEK293T-Zellen, die den *Viability Dye* aufnehmen. Von diesen drei Zellpopulationen misst man die Fluoreszenzemission in allen Detektorkanälen und kann basierend auf diesen Ergebnissen die "störenden" Signale in den überlappenden Bereichen herausrechnen.

Der Fixable Viability Dye eFluor® 780 kann durch rotes Laserlicht angeregt werden (Wellenlänge 633 nm) und emittiert Fluoreszenz bei einem Wellenlängen-Peak von 780 nm. Dieser Farbstoff färbt bzw. markiert permanent tote Zellen, sodass bei der folgenden Datenanalyse bzw. dem Gating nur *Viability Dye* negative Zellen (d.h. lebende Zellen) berücksichtigt werden. Bei der Kompensation für den Vitalitätsfarbstoff untersucht man eine Mischung von lebenden und toten Zellen, die vor der Durchflusszytometrie mit dem Farbstoff eingefärbt wurden.

Das Fluorophor *eGFP* wird durch blaues Laserlicht angeregt (Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm) und besitzt seinen Fluoreszenzemissionspeak bei 507 nm. Das *tdTomato* hingegen kann durch grünes Laserlicht angeregt werden (Laser mit einer Wellenlänge von 550 nm) und emittiert Fluoreszenz bei einem Wellenlängen-Peak von 581 nm.

Nach der Kompensation in Bezug auf die verschiedenen Farbstoffe erfolgt das *Gating* bei den Rohdaten des Experiments - hierbei geht es um eine Selektion spezifischer Zellen aus der Zellgesamtheit, die man genauer untersuchen möchte. Dies führt zu einer besseren bzw. höheren Auflösung des Experiments und seiner Ergebnisse. Im ersten Schritt des *Gating*-Prozesses werden die Daten des Experiments aus zwei Kanälen auf einer Punktwolke abgebildet – hier *forward scatter (FSC)* und *side scatter (SSC)* - und die zu untersuchende Zellpopulation wird durch eine polygonale Form eingerahmt (vergleiche Abb. 5) - nur die Zellen innerhalb des Rahmens werden nun weiter durch Betrachtung der anderen Kanäle analysiert. Dieser erste Schritt dient v.a. dem Ausschluss von Zelldebris, welches meist geringere *FSC*-Level zeigt.



Abb. 5: Abbildung der durchflusszytometrischen Rohdaten und des 1. Gating-Schritts zur Identifizierung der zu untersuchenden Zellpopulation (hier HEK293T-Zellen). Die polygonalen Umrandungen selektieren eine Zellsubpopulation aus der Zellgesamtheit heraus, die weiter analysiert werden soll. In diesem Fall sollen die umrandeten HEK293T-Zellen näher betrachtet werden. Insbesondere die Abgrenzung zum Zelldebris mit einem geringeren FSC-Level ist wichtig; FSC-A: Forward Scatter Area, SSC-A: Side Scatter Area

In einem zweiten Schritt sollen die einzelnen Zellen von Zelldupletten getrennt werden (siehe Abb. 6). Zelldupletten werden von den Detektoren als eine Zelle gewertet, obwohl es sich eigentlich um zwei separate Zellen bzw. Signale (*events*) handelt, die nur räumlich bzw. zeitlich sehr nah beieinander liegend den Dektektor passiert haben. Hierfür nutzt man den *FSC-H* (*forward scatter height*) gegen den *FSC-A* (*forward scatter area*).



Abb. 6: Abbildung der durchflusszytometrischen Daten nach dem 1. Gating-Schritt (Selektion der HEK293T-Zellen) und Darstellung des 2. Gating-Schritts zur Identifizierung der einzelnen HEK293T-Zellen. Die polygonalen Umrandungen selektieren eine Zellsubpopulation aus der Zellgesamtheit heraus, die weiter analysiert werden soll. In diesem Fall sollen die umrandeten einzelnen Zellen näher betrachtet werden. Hier ist die Abgrenzung von den Zelldupletten wichtig; FSC-A: Forward Scatter Area, FSC-H: Forward Scatter Height

Nach diesem 2. *Gating*-Schritt werden die lebenden Zellen von den toten, intakten Zellen (die nicht in Form des Zelldebris herauselektiert wurden) datentechnisch getrennt. Hierfür nutzt man den Kanal, der die Lichtemission des Vitalitätsfarbstoffes, den *Fixable Viability Dye eFluor* (**?** *780*, erfasst. Zellen, die den Farbstoff aufgenommen haben, sind tote Zellen und sollen nicht für die weitere Analyse berücksichtigt werden. Dementsprechend selektiert man die Zellen bzw. die *events*, die negativ für den *Viability Dye* sind (also lebende Zellen) und untersucht diese im nächsten Schritt weiter (vergleiche Abb. 7). Als weiterer Kanal wird hierbei der *FSC-A* genutzt.



Abb. 7: Abbildung der durchflusszytometrischen Daten nach dem 2. Gating-Schritt (Selektion der einzelnen HEK293T-Zellen) und Darstellung des 3. Gating-Schritts zur Identifizierung der lebenden Zellen. Die polygonalen Umrandungen selektieren eine Zellsubpopulation aus der Zellgesamtheit heraus, die weiter analysiert werden soll. In diesem Fall sollen die umrandeten lebenden Zellen näher betrachtet werden. Diese sind Viability Dye negativ, nehmen also den Farbstoff nicht auf. Dies wiederum ist ein Zeichen dafür, dass es lebende und keine toten Zellen sind. Hier ist die Abgrenzung der toten, Viability Dye positiven Zellen wichtig; FSC-A: Forward Scatter Area, Via: Fixable Viability Dye eFluor® 780

Im letzten *Gating*-Schritt werden die einzelnen, lebenden HEK293T-Zellen auf ihre Fluoreszenz bzw. auf die Fluoreszenz der beiden eingesetzten Farbstoffe *eGFP* und *tdTomato* untersucht. Dafür werden die Kanäle, in die die beiden Farbstoffe hauptsächlich emittieren, in Bezug zum *FSC-A*-Kanal gesetzt. Für die abschließende Analyse werden nur Zellen berücksichtigt bzw. eingerahmt, die *eGFP* bzw. *tdTomato* positiv sind – siehe hierzu Abb. 8 und Abb. 9.



Abb. 8: Abbildung der durchflusszytometrischen Daten nach dem 3. *Gating*-Schritt (Selektion der lebenden, einzelnen HEK293T-Zellen) und Darstellung des 4. *Gating*-Schritts zur Identifizierung der eGFP-positiven Zellen. Die polygonalen Umrandungen selektieren eine Zellsubpopulation aus der Zellgesamtheit heraus, die weiter analysiert werden soll. In diesem Fall sollen die umrandeten eGFP-positiven Zellen näher betrachtet werden. Hier ist die Abgrenzung zu den eGFP-negativen Zellen wichtig; FSC-A: Forward Scatter Area



Abb. 9: Abbildung der durchflusszytometrischen Daten nach dem 3. Gating-Schritt (Selektion der lebenden, einzelnen HEK293T-Zellen) und Darstellung des 4. Gating-Schritts zur Identifizierung der tdTomato-positiven Zellen. Die polygonalen Umrandungen selektieren eine Zellsubpopulation aus der Zellgesamtheit heraus, die weiter analysiert werden soll. In diesem Fall sollen die umrandeten tdTomato-positiven Zellen näher betrachtet werden. Hier ist die Abgrenzung zu den tdTomato-negativen Zellen wichtig; FSC-A: Forward Scatter Area

Nach dem *Gating* erhält man eine Übersicht über die Anzahl und prozentuale Verteilung der Zellen in den jeweiligen *Gating*-Gruppen. Hiermit kann man weitere statistische Untersuchungen vornehmen. Die *Gates* werden bei allen Proben identisch gesetzt, um möglichst vergleichbare Ergebnisse zu erzielen und Zellen mit vergleichbarer Fluoreszenzintensität (und gleichem *Cut-off-Wert*) zu berücksichtigen. Bei der Datenanalyse wird der prozentuale Anteil an fluoreszierenden Zellen an allen lebenden, einzelnen Zellen untersucht.

Um die intraexperimentelle Varianz zu verringern und die Aussagekraft der Untersuchung zu erhöhen, werden bei jeder Probe mindestens 10.000 *Viability Dye* negative Zellen untersucht. Man folgt hierbei in abgewandelter Form dem Protokoll von Korth et al. [238].

2.4.5 Sanger-Sequenzierung

2.4.5.1 Ablauf der Sangersequenzierung

Die Sangersequenzierung bzw. Didesoxymethode ist eine enzymatische Methode und dient der Bestimmung der Basenabfolge eines bestimmten DNA-Moleküls. Sie beruht in ihren Grundzügen auf dem Verfahren der PCR, nutzt hierbei aber die Fähigkeit der DNA-Polymerase, (fluoreszenzmarkierte) ddNTPs (Didesoxyribonukleosid-Triphosphate) einzubauen, die zum Kettenabbruch führen, da Ihnen die 3´-Hydroxygruppe zur Kettenverlängerung fehlt. Somit entstehen Fragmente unterschiedlicher Länge, die mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und so die Basenabfolge ermittelt werden kann. Bei der ursprünglichen Methode nach Sanger finden die Reaktionen in vier getrennten Reaktionsgefäßen statt, in dem jeweils eine Base als ddNTP in geringer Konzentration mitenthalten ist.

2.4.5.2 Sequenzierung über kommerziellen Anbieter

Die Basenabfolge der NCCR werden durch die Firma Eurofins Genomics Germany GmbH (Ebersberg, Germany) bestimmt. Diese nutzt die von der ursprünglichen Sanger-Methode modifizierte *Cycle-Sequencing*-Technologie auf ABI 3730XL-Sequenzern. Der große Unterschied zur klassischen Sanger-Methodik ist der Gebrauch einer hitzebeständigen DNA-Polymerase, wodurch die Sequenzierreaktion mit dem andauernden Temperaturwechsel (Denaturierung, Primerhybridisierung, Elongation) immer wieder in dem gleichen Gefäß wiederholt werden kann. Für genauere Informationen wird hier auf die von Eurofins zur Verfügung gestellten Informationen verwiesen.

Der Sequenzieransatz für die PCR-Produkte sowie für die Plasmid-DNA wird in *Safe-Lock-Tubes* zu Eurofins geschickt. Da die NCCR durch *Rearrangements* knapp 300 bp lang sein kann, wird von Eurofins für die Sequenzierung eines aufgereinigten PCR-Produkts eine Probenkonzentration von 1 ng/µL gefordert. Diese kann durch die nach der PCR-Produkt-Aufreinigung ermittelten Konzentrationen bestimmt werden. Anschließend wird auf ein Volumen von 15 µL mit nukleasefreiem Wasser aufgefüllt. Nun werden 2 µL Primer (*Klon R* oder *Klon F;* man analysiert die Sequenz in beide Leserichtungen) mit einer Konzentration von 10 pmol/µL (10 µM) hinzugegeben, sodass das Endvolumen 17 µL beträgt.

Bei der Sequenzierung der Plasmid-DNA (< 30 kbp) wird eine Konzentration von 50-100 ng/ μ L gefordert. Hier wird ebenfalls auf ein Volumen von 15 μ L mit nukleasefreiem Wasser aufgefüllt und anschließend 2 μ L Primer ("inneres Primperpaar", *Klon R* oder *Klon F*) mit einer Konzentration von 10 pmol/ μ L (10 μ M) hinzugegeben. Auch hier beträgt das Endvolumen 17 μ L.

2.4.5.3 Ergebnisübermittlung

Die Ergebnisse werden von Eurofins als *fasta*-Datei zur Verfügung gestellt. Zusätzlich wird ein Qualitätsreport generiert, der die Qualitätswerte zu jeder Base enthält. Hierdurch kann man eine entsprechend hohe Sequenzierungsqualität bzw. Korrektheit der Ergebnisse garantieren.

Über ein Sequenzanalysenprogrammen (Geneious Prime [®], Version 2020.1.2) wird die Consensussequenz des PCR-Produkts aus den beiden Leserichtungen (*forward* und *reverse*) ermittelt und in einem weiteren Schritt gegen den Archetyp alignt bzw. annotiert.

2.4.6 Tiefensequenzierung

2.4.6.1 Ablauf der Tiefensequenzierung

Die Tiefensequenzierung, auch *Next-Generation-Sequencing (NGS)* genannt, erfolgt nach einem ähnlichen Prinzip wie die Sangersequenzierung – auch hier baut eine DNA-Polymerase fluoreszenzmarkierte ddNTPs in eine DNA-Vorlage im Rahmen von aufeinanderfolgenden Zyklen der DNA-Synthese ein. In jedem Zyklus wird ein weiteres Nukleotid dem neu gebildeten Strang hinzugefügt - welches Nukleotid in dem jeweiligen Zyklus eingebaut wird, wird über Fluorophor-Anregung detektiert.

Der entscheidende Unterschied zur Sangersequenzierung ist, dass bei der Tiefensequenzierung nicht ein DNA-Strang sequenziert wird, sondern Millionen von DNA-Fragmenten parallel. Zudem kommt es hierbei nicht zu einem terminalen Kettenabbruch durch Einbau eines ddNTPs, sondern zu einer reversiblen Terminierung des Syntheseprozesses. Dies gelingt durch ein Enzym, dass nach Einbau und Fluorophor-Anregung des ddNTPs dieses in ein dNTP (Desoxynukleosidtriphosphat) umwandelt, am dem die DNA-Strang-Synthesereaktion fortgesetzt werden kann. Die Erfassung der Nukleotid- bzw. Basenabfolge der Sequenz läuft also parallel zur Synthese des komplementären DNA-Strangs ab – dieses Prinzip wird *Sequencing by Synthesis (SBS)* genannt.

Man kann das Verfahren der Tiefensequenzierung grob in vier Schritte unterteilen:

- Vorbereitung der "DNA-Bibliothek" durch Fragmentation der zu untersuchenden Sequenz in kleine DNA-Bruchstücke,
- Adaption der DNA-Fragmente auf einer Matrix und Amplifikation derselben in Form von klonalen Clustern,
- Sequenzierung in Form des SBS und
- als letzten Schritt Datenanalyse und Annotation auf die Referenzsequenz.

Nach dem Erzeugen kleiner DNA-Fragmente werden diese mit speziellen Adapteroligonukleotiden an beiden Enden (5´und 3´) ligiert. Die Adapter-ligierten Fragmente werden anschließend auf einen Glasobjektträger (*flow cell*) aufgebracht. Die Adapter binden dort an komplementäre Oligonukleotide, die auf dem Glasobjektträger gebunden sind. Anschließend wird jedes einzelne Fragment in Form von klonalen Clustern durch die *"bridge amplification"* amplifiziert und ist jetzt bereit für den eigentlichen Sequenzierungsprozess.

Dafür werden die vier unterschiedlichen fluoreszenzmarkierten Nukleotide (mit den vier entsprechenden Basen) auf den Objektträger gebracht und beginnen mit der Synthese der komplementären Stränge der verschiedenen Fragment-Cluster. In jedem Zyklus wird ein weiteres Nukleotid hinzugefügt – dessen Fluoreszenzfarbstoff (der für die jeweilige Base kodiert) wird durch Laser und Bilderkennung identifiziert. Im nächsten Schritt wird dieses Farbstoffmolekül, das die weitere Synthese blockiert, enzymatisch abgespalten und es kann ein weiteres Nukleotid eingebaut und identifiziert werden. Diese Schritte erfolgen parallel an allen Fragment-Clustern, bis die vollständige Basenabfolge der zu untersuchenden Sequenz ermittelt werden konnte. Im letzten Schritt werden die Daten mithilfe bioinformatischer Software gegen die Referenzsequenz annotiert und Unterschiede zu dieser in Form von Einzelnukleotidpolymorphismen (*single nucleotide polymorphism – SNG*) oder größerer Insertionen/Deletionen herausgearbeitet.

Mit diesem Verfahren ist es also nicht nur möglich, die Abfolge der Consensussequenz zu ermitteln (bzw. zu bestätigen) wie bei der Sanger-Sequenzierung, sondern auch die Abfolge prozentual seltener vorkommender Sequenzvarianten (Quasispezies bzw. Minorvarianten) in der untersuchten Probe bis in den unteren Prozentbereich festzustellen, während bei der Sanger-Sequenzierung Minorvarianten mit Varianzen an einzelnen Nukleotidpositionen nur detektiert werden können, wenn deren Anteil bei ca. 15-20% liegt.

2.4.6.2 Sequenzierung über kommerziellen Anbieter

Die "*Next-Generation*"-Sequenzierungen wurden bei der Firma SEQ-IT GmbH & Co KG (Kaiserslautern, Germany) auf Illumina® Sequenzierern (MiSeq Desktop; Illumina®, Inc., San Diego, USA) durchgeführt. Die Art der *Library Preparation* ist TruSeq nano, 0,5% MiSeq. Für genauere Angaben wird an dieser Stelle auf die Angaben der Firma SeqIT sowie Illumina verwiesen.

Von der Firma SeqIT wurden 200 ng aufgereinigtes PCR-Produkt, der zugehörige Reinheitsgrad (260/280-Wert) sowie Angaben zur Länge bzw. Größe der Sequenz in bp zur Durchführung der Sequenzierungen verlangt. Dieses wurde in 0,2 mL PCR-*Tube-Strips* verschickt, das einzusendende Volumen ergab sich anhand der Konzentration des aufgereinigten PCR-Produkts und wurde nicht wie bei der Sangersequenzierung auf ein Fixvolumen z.B. mit nukleasefreiem Wasser aufgefüllt. Da die Tiefensequenzierung unabhängig von den Amplifikationsprimern funktioniert, sind diese für diese Sequenzierungsmethode nicht notwendig. Für das Mapping der ermittelten Quasispezies wurde im Vorhinein die Consensussequenz als *fasta*-Datei der zu untersuchenden JCV-NCCR-Variante übermittelt.

2.4.6.3 Ergebnisübermittlung

Die Ergebnisse werden auch hier als *fasta*-Datei bzw. *fasta*-Files zur Verfügung gestellt. Bei den gefundenen Quasispezies der Probe werden die absoluten sowie die relativen Anteile der jeweiligen Sequenz als Information mitgeliefert – die Dateien enthalten die 10 häufigsten Varianten der Probe, die bereits gegen die jeweilige Referenz/Consensussequenz aligniert wurden. Bei der Bewertung der Ergebnisse werden nur Varianten berücksichtigt, die relativ mind. 1% aller ermittelten *Reads* darstellen. Über ein Sequenzanalysenprogramm (hier Geneious Prime ®) wird die Quasispezies-NCCR-Sequenz sowohl gegen den Archetyp als auch gegen die zugehörige Consensussequenz annotiert.

2.5 Statistische Auswertung sowie verwendete Programme

Für die Auswertung der in dieser Untersuchung erhobenen Ergebnisse werden verschiedene statistische Berechnungen durchgeführt, Sequenzen analysiert und visuell veranschaulicht sowie Graphen und Abbildungen erstellt.

Für die Sequenzanalyse und -annotation wird die bioinformatische Software für Sequenzdatenanalyse "Geneious Prime [®]" in der Version 2020.1.2 verwendet. Die Sequenzabfolge wird mithilfe von "OmniGraffle", einem Tool zur Erstellung von Diagrammen und digitalen Illustrationen, veranschaulicht (Version 7.14.1).

Zur Verarbeitung der mittels Durchflusszytometrie erhobenen Datensätze wird die Software "FlowJo" in der Version 10.7.1 genutzt.

Für die statistische Auswertung wird mit dem Programm "RStudio" in der Version 1.2.5019 mithilfe der Programmiersprache "R" in der Version 3.6.2 gearbeitet.

Die statistischen Ergebnisse werden in Form von Diagrammen und Grafiken mithilfe der Visualisierungsbibliothek "seaborn" (Version: 0.11) und der dafür benötigten Programmiersprache "Python" in der Version 3.6.9 veranschaulicht.

Bei der Auswertung der mittels Durchflusszytometrie gewonnenen Daten wird mit multi- und bivariaten Korrelationsanalysen gearbeitet. Bei der multivariaten Korrelationsanalyse führt man eine lineare Regressionsanalyse mit einer Zielgröße und mehreren beeinflussenden Variablen durch. Bei der bivariaten Analyse nutzt man einerseits eine lineare Regressionsanalyse mit einer Zielgröße und nur einer beeinflussenden Variablen, andererseits macht man Gebrauch von Welch's t-Test. Bei beiden Tests wird der zugehörige p-Wert mit angegeben, also die Wahrscheinlichkeit oder das kleinste Signifikanzniveau, bei dem die Nullhypothese, die von einem Nicht-Bestehen eines statistisch signifikanten Unterschieds zweier Stichproben ausgeht, noch verworfen werden kann. Je kleiner der p-Wert, desto kleiner ist der alpha-Fehler (Nullhypothese verworfen, obwohl wahr) und desto sicherer kann man die Nullhypothese zugunsten der Alternativhypothese, die von einem signifikanten Unterschied ausgeht, verwerfen. Hierbei wird ein p-Wert <5% als statistisch signifikant (bzw. ein p-Wert <10% als schwach signifikant) bewertet. Mit folgender Beschriftungslegende wird in den statistischen Abbildungen gearbeitet: *p<5%, **p<1%, ***p<0,1%, ****p<0,01%.

2.6 Ethikvotum

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit humanem Körpermaterial wurden seitens der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf geprüft und beurteilt und es wurden keinerlei ethische oder rechtliche Bedenken bzgl. der Versuche geäußert. Die Untersuchung ist unter der Studiennummer "2019-604-andere Forschung erstvotierend" mit dem Titel "Molekulare und funktionale Analyse der nicht-kodierenden Kontrollregion (NCCR) des humanen Polyomavirus JC bei Patienten mit einer Progressiven Multifokalen Leukenzephalopathie (PML)" geführt (Registrierungsnummer: 2019065162) und das Ethikvotum wurde am 28.08.2019 erlassen.

3 Ergebnisse

3.1 Sangersequenzen der Liquor- und Serumproben in Bezug auf Archetyp

3.1.1 Hintergrund der Untersuchung

Bei der vorliegenden Untersuchung wurde ein spezieller Fokus auf die nicht-kodierende Kontrollregion des JC-Virus gelegt. Die NCC-Region wurde mit den bereits oben beschriebenen Verfahren sequenziert – im ersten Schritt mit der Methode nach Sanger, durch die die Consensussequenz (also die am häufigsten vorkommende Variante) bestimmt werden kann. Im weiteren Verlauf der Untersuchung wurde die NCCR aber auch mittels Tiefensequenzierung untersucht, bei der mögliche Subvarianten/Minorvarianten, die prozentual gesehen seltener in der Patientenprobe zu finden sind als die Consensussequenz, ermittelt werden können. Die durch Sanger-Sequenzierung analysierten NCC-Regionen werden im Folgenden nun auf den Archetyp des JC-Virus ausgerichtet bzw. annotiert und entsprechende Veränderungen (Insertionen, Deletionen, Punktmutationen, *Rearrangements*) herausgearbeitet. Eine ähnliche Analyse der bei der Tiefensequenzierung gefundenen Minor-Varianten erfolgt im weiteren Verlauf dieser Arbeit.

Der Archetyp setzt sich aus 7 Teilabschnitten zusammen: "ori" (*origin of replication*, 12 bp), "a" (25 bp), "b" (23 bp), "c" (55 bp), "d" (66 bp), "e" (18 bp) und "f" (69 bp) – die Basen jedes Teilabschnitts werden jeweils beginnend mit 1 (z.B. a (1-25), b (1-23)) durchnummeriert, sodass eine klare Lokalisation der entsprechenden *Rearrangements* bzw. anderer Veränderungen möglich ist. Eine schematische Abbildung des JCV-Archetyps sowie des typischen PML-Typs "MAD1" sind in der untenstehenden Abb. 10 zu sehen.



Abb. 10: Schematische Darstellung des JCV-Archetyps und des PML-Typs MAD1. Die Buchstaben sowie Nummern in Klammern beziehen sich auf das Gliederungs- und Nummerierungsschema des JCV-Archetyps; ORI = origin of replication (umfasst 12 bp).

In der vorliegenden Untersuchung wurden insgesamt 10 Probenpaare (jeweils bestehend aus einer Liquor- und einer Serumprobe) von 10 unterschiedlichen Patienten untersucht. Im Folgenden werden vereinfacht die Termini "Liquorsequenz" bzw. "Serumsequenz" verwendet. Hiermit ist stets die in der Liquorprobe bzw. in der Serumprobe eines Patienten gefundene NCCR gemeint.

Die Liquor- und Serumproben jedes einzelnen Patienten wurden am jeweils gleichen Tag entnommen. Die Liquorsequenz wurde mit der entsprechenden im Serum gefundenen Sequenz verglichen. Bei 7 von 10 Paaren zeigte sich eine sowohl im Liquor als auch im Serum übereinstimmende Consensussequenz, d.h. eine exakt gleiche Basenabfolge mit gleicher Basenpaarlänge. Bei 3 der 10 Paare wurden teils größere Unterschiede zwischen der Liquor- und Serumsequenz gefunden, insbesondere bei den Patienten 1 und 2.

Zudem wurden Einzelproben von 6 anderen Patienten analysiert, darunter 3 Liquor- und 3 Serumproben. Lediglich bei der Serumsequenz von Patient 16 konnte der Archetyp nachgewiesen werden, alle anderen 25 NCCR der Patientenproben wiesen Veränderungen in Bezug auf die "ursprüngliche" Archetypsequenz auf.

Die untersuchten Sequenzen zeigten eine sehr hohe Diversität in Bezug auf den Archetyp, aber auch untereinander. Die Veränderungen reichten von Punktmutationen, fehlenden bzw. zusätzlichen Basen hin zu Deletionen, Duplikationen und Insertionen von ganzen Teilabschnitten. Im Folgenden werden diese Veränderungen näher erläutert. Der Übersicht halber werden die 3 Liquor-Serum-Paare, bei denen Unterschiede in den jeweiligen Sequenzen vorliegen, zuerst erläutert. Danach folgen die 7 Paare mit identischer Liquor-Serum-Sequenz, die Einzelsequenzen folgen daraufhin.

3.1.2 Verschiedene Sequenzen in Liquor und Serum bei einem Patientenprobenpaar

Patient 1:



Abb. 11: Schematische Darstellung der Liquor- und Serumsequenz von Patient 1 in Bezug auf die JCV-Archetyp-Gliederung. Die Buchstaben sowie Nummern in Klammern beziehen sich auf das Gliederungs- und Nummerierungsschema des JCV-Archetyps. Sie geben an, welche Basen bzw. Nukleotide des JCV-Archetyps in dieser Sequenz enthalten sind und ob das entsprechende Teilstück in seiner ursprünglichen Länge vorhanden oder verkürzt ist; # = Patient, CSF = Cerebrospinal fluid (Liquor), S = Serum (Serum), ORI = origin of replication (umfasst 12 bp), • = fehlende Base.

Die Liquorsequenz des 1. Patienten setzt sich folgendermaßen zusammen: a (vollständig: 1-25), b (erste 12 bp enthalten), c (letzte 41 bp), d (erste 25 bp), d (letzte/66. Base), e (vollständig: 1-18), f (erste 8 bp), b (letzte 13 bp), c (vollständig: 1-55), d (erste 25 bp), d (letzte/66. Base), e (vollständig: 1-18), f (vollständig: 1-69).

Die korrespondierende Serumsequenz lautet wie folgt: a (vollständig: 1-25), b (vollständig: 1-23), c (erste 13 bp), e (vollständig: 1-18), f (erste 12 bp), c (Teilstück 13-31, insgesamt 19 bp), d (letzte 3 bp), e (vollständig: 1-18), f (fehlendes Adenin (A) und Guanin (G) an Position 19+20, sonst vollständig: 1-69).

Die Serumsequenz ist somit stark verändert gegenüber der Liquorsequenz – die Serumsequenz ist deutlich kürzer (311 bp (*CSF*) vs. 216 bp (*S*)) und weist nicht die zwei identischen Anteile von d (d 1-25) wie die Liquorsequenz auf (siehe Abb. 11). Diese weist hingegen mehr Insertionen von teils vollständigen Teilstücken (wie sie auch im Archetyp zu finden sind bzw. verkürzt) auf (doppeltes Vorkommen von b, c, d, e sowie von f), während im Serum nur c, e und f in vollständiger bzw. abgewandelter Form vorkommen. Die Länge und Vollständigkeit der Teilstücke variiert ebenfalls zwischen der Liquor- und Serumsequenz. Übereinstimmend ist das zweimalige Vorkommen des Teilstücks e, gefolgt von einem vollständigen bzw. anteiligen Teilstück f.

Patient 2:



Abb. 12: Schematische Darstellung der Liquor- und Serumsequenz von Patient 2 in Bezug auf die JCV-Archetyp-Gliederung. Die Buchstaben sowie Nummern in Klammern beziehen sich auf das Gliederungs- und Nummerierungsschema des JCV-Archetyps. Sie geben an, welche Basen bzw. Nukleotide des JCV-Archetyps in dieser Sequenz enthalten sind und ob das entsprechende Teilstück in seiner ursprüngliche Länge vorhanden oder verkürzt ist; # = Patient, CSF = Cerebrospinal fluid (Liquor), S = Serum (Serum), ORI = origin of replication (umfasst 12 bp), \bullet = fehlende Base, \star = Punktmutation.

Auch bei Patient 2 zeigen sich größere Unterschiede zwischen der im Liquor und der im Serum gefundenen Sequenz. Die Liquorsequenz baut sich zusammen aus: a (vollständig: 1-25), b (vollständig: 1-23), c (erste 27 bp enthalten), d (letzte 8 bp), e (erste 15 bp), b (letzte 10 bp), c (erste 27 bp enthalten), d (letzte 8 bp), e (vollständig. 1-18), d (letzte 14 bp), e (vollständig: 1-18), f (vollständig: 1-69).

Die Serumsequenz hingegen sieht folgendermaßen aus: a (vollständig: 1-25), b (vollständig: 1-23), c (fehlendes Guanin an Position 35, sonst vollständig: 1-55), e (Punktmutationen an Position 3 (Thymin (T) durch A ersetzt), 4 (A->G) und 5 (A->G), sonst vollständig: 1-18), f (erste 12 bp), b (letzte Base), c (fehlendes G an Position 35, sonst vollständig: 1-55), e (Punktmutationen an Position 3 (T->A), 4 (A->G) und 5 (A->G), sonst vollständig: 1-69).

Die Liquorsequenz besteht im Gegensatz zu der Serumsequenz aus mehreren, kürzeren bzw. unvollständigen Teilstücken (entsprechend Abb. 12). Diese kommen in identischer (zweimal c (1-27), zweimal d (59-66) sowie zweimal e (1-18)), aber auch in kürzerer (e (1-15), b (14-23)) und längerer (d (53-66) Form vor. Die Serumsequenz zeigt auch duplizierte Anteile, allerdings sind hier die Teilstücke meist vollständig bzw. zeigen repetitiv die gleichen Basenveränderungen (bei c eine fehlende Base, bei e Punktmutationen). Das Teilstück d fehlt hier vollständig. Der Längenunterschied bei diesem Sequenzpaar beträgt 12 bp und ist somit nicht so groß wie bei #1.

Patient 3:



Abb. 13: Schematische Darstellung der Liquor- und Serumsequenz von Patient 3 in Bezug auf die JCV-Archetyp-Gliederung. Die Buchstaben sowie Nummern in Klammern beziehen sich auf das Gliederungs- und Nummerierungsschema des JCV-Archetyps. Sie geben an, welche Basen bzw. Nukleotide des JCV-Archetyps in dieser Sequenz enthalten sind und ob das entsprechende Teilstück in seiner ursprüngliche Länge vorhanden oder verkürzt ist; # = Patient, CSF = Cerebrospinal fluid (Liquor), S = Serum (Serum), ORI = origin of replication

= Patient, CSF = Cerebrospinal fluid (Liquor), S = Serum (Serum), ORI = origin of replication (umfasst 12 bp).

Bei Patient 3 zeigen sich nur in einem Teilstück Veränderungen zwischen der im Liquor und der im Serum gefundenen Sequenz. Der Vollständigkeit halber erfolgt trotzdem eine genaue Beschreibung der beiden Sequenzen. Die Abfolge der Liquorsequenz lautet: a (vollständig: 1-25), b (vollständig: 1-23), c (vollständig: 1-55), d (erste 4 bp enthalten), d (letzte 7 bp), e (vollständig: 1-18), b (letzte 10 bp), c (vollständig: 1-55), d (erste 4 bp), d (letzte 7 bp), e (vollständig: 1-18), f (vollständig: 1-69).

Bei der Serumsequenz liegt der Unterschied in dem zweiten Teilstück c, bei dem mittige Basenpaare (32-44) fehlen: a (vollständig: 1-25), b (vollständig: 1-23), c (vollständig: 1-55), d (erste 4 bp), d (letzte 7 bp), e (vollständig: 1-18), b (letzte 10 bp), c (erste 31 bp), c (letzte 11 bp), d (erste 4 bp), d (letzte 7 bp), e (vollständig: 1-18), f (vollständig: 1-69) – siehe hierzu Abb. 13.

Durch die fehlenden Basen im Teilstück c ergibt sich der Sequenzlängenunterschied von 13 bp.

3.1.3 Identische Sequenzen in Liquor und Serum bei einem Patientenprobenpaar

Nun folgt die Beschreibung der Liquor-Serum-Paare der Patienten, bei denen eine übereinstimmende Consensussequenz gefunden werden konnte – das bedeutet, dass die im Liquor mittels Sangersequenzierung gefundene Sequenz identisch zu der im Serum mittels Sangersequenzierung gefundenen Sequenz ist. Übersichtshalber wird deswegen in den folgenden schematischen Abbildungen nur einmal (und nicht zweimal für Liquor bzw. Serum) die Sequenz abgebildet.

Patient 4:



Abb. 14: Schematische Darstellung der identischen Consensussequenz im Liquor und Serum von Patient 4 in Bezug auf die JCV-Archetyp-Gliederung. Die Buchstaben sowie Nummern in Klammern beziehen sich auf das Gliederungs- und Nummerierungsschema des JCV-Archetyps. Sie geben an, welche Basen bzw. Nukleotide des JCV-Archetyps in dieser Sequenz enthalten sind und ob das entsprechende Teilstück in seiner ursprünglichen Länge vorhanden oder verkürzt ist;

= Patient, CSF = Cerebrospinal fluid (Liquor), S = Serum (Serum), ORI = origin of replication (umfasst 12 bp), \bullet = fehlende Base, \star = Punktmutation.

Die bei Patient 4 gefundene Sequenz in Liquor und Serum (Abb. 14) stimmt mit der bei Patient 2 im Serum gefundenen Sequenz überein. Ihr Aufbau lautet: a (vollständig: 1-25), b (vollständig: 1-23), c (fehlendes G an Position 35, sonst vollständig: 1-55), e (Punktmutationen an Position 3 (T->A), 4 (A->G) und 5 (A->G), sonst vollständig: 1-18), f (erste 12 bp), b (letzte Base), c (fehlendes G an Position 35, sonst vollständig: 1-55), e (Punktmutationen an Position 3 (T->A), 4 (A->G) und 5 (A->G), sonst vollständig: 1-55), e (Punktmutationen an Position 3 (T->A), 4 (A->G) und 5 (A->G), sonst vollständig: 1-18), f (vollständig: 1-69). Auch hier zeigt sich das Bild der gleichen wiederholenden Mutationen in den duplizierten Teilabschnitten c und e und das vollständige Fehlen des Teilabschnitts d.

Patient 5:



Abb. 15: Schematische Darstellung der identischen Consensussequenz im Liquor und Serum von Patient 5 in Bezug auf die JCV-Archetyp-Gliederung. Die Buchstaben sowie Nummern in Klammern beziehen sich auf das Gliederungs- und Nummerierungsschema des JCV-Archetyps. Sie geben an, welche Basen bzw. Nukleotide des JCV-Archetyps in dieser Sequenz enthalten sind und ob das entsprechende Teilstück in seiner ursprünglichen Länge vorhanden oder verkürzt ist;

= Patient, CSF = Cerebrospinal fluid (Liquor), S = Serum (Serum), ORI = origin of replication (umfasst 12 bp), ▼ = zusätzliche Base.

Die Liquor-Serum-Consensussequenz von Patient 5 ähnelt in seinem Grundaufbau der von Patient 4: a (vollständig: 1-25), b (vollständig: 1-23), c (erste 52 bp, zusätzliche Base C zwischen der 49. und 50. Base), e (vollständig: 1-18), f (erste 7 bp), zwei zusätzliche Basen (C+G; Ursprung nicht genau definierbar), b (vollständig: 1-23), c (erste 52 bp, zusätzliche Base C zwischen der 49. und 50. Base), e (vollständig: 1-18), f (vollständig: 1-69) – entsprechend Abb. 15.

Bei dieser Sequenz wird insbesondere das *Rearrangement* bzw. die Duplikationen ganzer Teilstücke (b und e) beobachtet sowie das wiederholende Auftreten der gleichen Mutationen in einem Teilstück (hier gleiche Veränderung in Teilstück c).

Patient 6:



Abb. 16: Schematische Darstellung der identischen Consensussequenz im Liquor und Serum von Patient 6 in Bezug auf die JCV-Archetyp-Gliederung. Die Buchstaben sowie Nummern in Klammern beziehen sich auf das Gliederungs- und Nummerierungsschema des JCV-Archetyps. Sie geben an, welche Basen bzw. Nukleotide des JCV-Archetyps in dieser Sequenz enthalten sind und ob das entsprechende Teilstück in seiner ursprünglichen Länge vorhanden oder verkürzt ist;

= Patient, CSF = Cerebrospinal fluid (Liquor), S = Serum (Serum), ORI = origin of replication (umfasst 12 bp), \bullet = fehlende Base, \star = Punktmutation.

Bei der im Liquor und Serum gefundenen Sequenz bei Patient 6 (siehe Abb. 16) wurde die gleiche Sequenz wie bei Patient 4 im Liquor und Serum und bei Patient 2 im Serum gefunden. Die Abfolge lautet wie folgt: a (vollständig: 1-25), b (vollständig: 1-23), c (fehlendes G an Position 35, sonst vollständig: 1-55), e (Punktmutationen an Position 3 (T->A), 4 (A->G) und 5 (A->G), sonst vollständig: 1-18), f (erste 12 bp), b (letzte Base), c (fehlendes G an Position 35, sonst vollständig: 1-55), e (Punktmutationen an Position 3 (A->G), sonst vollständig: 1-55), e (Punktmutationen an Position 3 (T->A), 4 (A->G), sonst vollständig: 1-55), e (Punktmutationen an Position 3 (T->A), 4 (A->G), sonst vollständig: 1-18), f (vollständig: 1-69). Auffallend ist hier erneut das vollständige Fehlen des Teilabschnitts d sowie das wiederholte Auftreten der gleichen Mutationen in den jeweils duplizierten Teilabschnitt c und e.

Patient 7:



Abb. 17: Schematische Darstellung der identischen Consensussequenz im Liquor und Serum von Patient 7 in Bezug auf die JCV-Archetyp-Gliederung. Die Buchstaben sowie Nummern in Klammern beziehen sich auf das Gliederungs- und Nummerierungsschema des JCV-Archetyps. Sie geben an, welche Basen bzw. Nukleotide des JCV-Archetyps in dieser Sequenz enthalten sind und ob das entsprechende Teilstück in seiner ursprünglichen Länge vorhanden oder verkürzt ist;

= Patient, CSF = Cerebrospinal fluid (Liquor), S = Serum (Serum), ORI = origin of replication (umfasst 12 bp), • = fehlende Base.

Die vorliegende Serum-Liquor-Consensussequenz von Patient 7 weist ebenfalls *Rearrangements* vollständiger Teilstücke auf (Abb. 17). Die in Abschnitt e auftretenden Mutationen zeigen sich in den beiden, bei dieser Sequenz vorhandenen Teilabschnitten von e. Das Teilstück c ist vollständig dupliziert, während bzgl. Teilstück d eine komplette Deletion festzustellen ist. Die Sequenz ist folgendermaßen zusammengesetzt: a (vollständig: 1-25), b (vollständig: 1-23), c (vollständig: 1-55), e (fehlendes T und A an Position 3 und 4, sonst vollständig: 1-18), b (letzte Base), c (vollständig: 1-55),

e (fehlendes T und A an Position 3 und 4, sonst vollständig: 1-18), f (erste 17 Basen), f (bis auf erste fehlende Base vollständig: 2-69).

Patient 8:



Abb. 18: Schematische Darstellung der identischen Consensussequenz im Liquor und Serum von Patient 8 in Bezug auf die JCV-Archetyp-Gliederung. Die Buchstaben sowie Nummern in Klammern beziehen sich auf das Gliederungs- und Nummerierungsschema des JCV-Archetyps. Sie geben an, welche Basen bzw. Nukleotide des JCV-Archetyps in dieser Sequenz enthalten sind und ob das entsprechende Teilstück in seiner ursprünglichen Länge vorhanden oder verkürzt ist;

= Patient, CSF = Cerebrospinal fluid (Liquor), S = Serum (Serum), ORI = origin of replication (umfasst 12 bp), \bullet = fehlende Base, \star = Punktmutation.

Bei der Consensussequenz des 8. Patienten hingegen findet man vor allem unvollständige Teilstücke, bzgl. c und d wiederholen sich diese im gleichen Umfang und Abschnitt: a (vollständig: 1-25), b (vollständig: 1-23), c (erste 33 bp), d (letzte 9 bp), e (erste 11 bp), a (Teilstück: 13-20, insgesamt 8 bp),), c (erste 33 bp), d (letzte 9 bp), e (vollständig: 1-18), f (fehlende Basen A und G an Position 19 und 20, zusätzlich Punktmutation an Position 24 (A->G), sonst vollständig: 1-69) – siehe hierzu Abb. 18.

Patient 9:



Abb. 19: Schematische Darstellung der identischen Consensussequenz im Liquor und Serum von Patient 9 in Bezug auf die JCV-Archetyp-Gliederung. Die Buchstaben sowie Nummern in Klammern beziehen sich auf das Gliederungs- und Nummerierungsschema des JCV-Archetyps. Sie geben an, welche Basen bzw. Nukleotide des JCV-Archetyps in dieser Sequenz enthalten sind und ob das entsprechende Teilstück in seiner ursprünglichen Länge vorhanden oder verkürzt ist;

```
# = Patient, CSF = Cerebrospinal fluid (Liquor), S = Serum (Serum), ORI = origin of replication (umfasst 12 bp), ▼ = zusätzliche Base, ● = fehlende Base.
```

Die im Liquor und Serum detektierbare Sequenz des Patienten Nr. 9 zeichnet sich vor allem durch veränderte bzw. duplizierte Teilabschnitte des Teilstücks c und d aus, wie in Abb. 19 gezeigt. Lediglich Teilstück a, e und f sind in der im Archetyp vorhandenen Form in dieser Sequenz zu finden, wobei eine Base im Teilstück e fehlt. Die genaue Abfolge der *Rearrangements* lautet: a (vollständig: 1-25), b (erste 14 bp), c (letzte 23 bp), d (erste 23 bp), c (Teilstück: 15-26, insgesamt 12 bp), d (letzte 14 bp), zusätzliche Base (A; Ursprung nicht genau definierbar), d (Teilstück: 6-23; insgesamt 18 bp), c (Teilstück: 15-26, insgesamt 12 bp), d (letzte 14 bp), e (fehlende Base A an Position 10, sonst vollständig: 1-18), f (vollständig: 1-69). Prominent ist hierbei das vermehrte Auftreten von Teilstücken des Teilabschnitts d.

Patient 10:



Abb. 20: Schematische Darstellung der identischen Consensussequenz im Liquor und Serum von Patient 10 in Bezug auf die JCV-Archetyp-Gliederung. Die Buchstaben sowie Nummern in Klammern beziehen sich auf das Gliederungs- und Nummerierungsschema des JCV-Archetyps. Sie geben an, welche Basen bzw. Nukleotide des JCV-Archetyps in dieser Sequenz enthalten sind und ob das entsprechende Teilstück in seiner ursprünglichen Länge vorhanden oder verkürzt ist;

= Patient, CSF = Cerebrospinal fluid (Liquor), S = Serum (Serum), ORI = origin of replication (umfasst 12 bp).

Die Consensussequenz des Liquor-Serum-Paars bei Patient 10, dargestellt in Abb. 20, ist gekennzeichnet durch die repetitive Deletion im Teilstück c, bei dem die Basenpaare 30-33 fehlen, sowie dem fast vollständigen Fehlen des Teilabschnitts d. Die duplizierten Teilabschnitte sind bei dieser Sequenz meist nicht identisch (Vorkommen bei b, c und e). Detailliert lautet die Sequenz wie folgt: a (vollständig: 1-25), b (erste 16 bp), c (Teilstück: 13-29; insgesamt 17 bp), c (Teilstück: 34-46; insgesamt 13 bp), d (letzte 5 bp), e (erste 11 bp), b (letzte 19 bp), c (erste 29 bp), c (Teilstück: 34-46; insgesamt 13 bp), d (letzte 5 bp), e (vollständig: 1-18), f (vollständig: 1-69).

3.1.4 Einzelsequenzen

Im Folgenden werden nun die Einzelsequenzen von den Patienten 11-16 näher analysiert. Von diesen liegt entweder nur die Consensussequenz der Liquor- oder der Serumprobe vor.

Patient 11:



Abb. 21: Schematische Darstellung der Consensussequenz im Liquor von Patient 11 in Bezug auf die JCV-Archetyp-Gliederung. Die Buchstaben sowie Nummern in Klammern beziehen sich auf das Gliederungs- und Nummerierungsschema des JCV-Archetyps. Sie geben an, welche Basen bzw. Nukleotide des JCV-Archetyps in dieser Sequenz enthalten sind und ob das entsprechende Teilstück in seiner ursprüngliche Länge vorhanden oder verkürzt ist; # = Patient, CSF = Cerebrospinal fluid (Liquor), ORI = origin of replication (umfasst 12 bp), * = Punktmutation • = fehlende Base.

Die Liquorsequenz von Patient 11 (siehe Abb. 21) weist sehr viele Rearrangments und Duplikationen, insbesondere von kurzen, unvollständigen Teilstücken auf, die sich aber in Länge und Form häufig wiederholen (bei Teilstück c und d). Konkret lautet die Abfolge: a (erste 21 bp), b (Punktmutation an Position 20 (A->G); sonst vollständig: 1-23), c (erste 27 bp), d (letzte 8 bp), vermutlich e (erste 3 bp), c (Teilstück: 16-27; insgesamt 12 bp), d (letzte 8 bp), e (erste 9 bp), b (Punktmutation an Position 20 (A->G); Teilstück: 20-23, insgesamt 4 bp), c (erste 27 bp), d (letzte 8 bp), e (vollständig: 1-18), f (erste 8 bp), f (fehlende Base T an Position 29;Teilstück: 28-69, insgesamt 41 bp).

Patient 12:



Abb. 22: Schematische Darstellung der Consensussequenz im Liquor von Patient 12 in Bezug auf die JCV-Archetyp-Gliederung. Die Buchstaben sowie Nummern in Klammern beziehen sich auf das Gliederungs- und Nummerierungsschema des JCV-Archetyps. Sie geben an, welche Basen bzw. Nukleotide des JCV-Archetyps in dieser Sequenz enthalten sind und ob das entsprechende Teilstück in seiner ursprüngliche Länge vorhanden oder verkürzt ist; # = Patient, CSF = Cerebrospinal fluid (Liquor), ORI = origin of replication (umfasst 12 bp), • = fehlende Base.

Bei Patient 12 lag ebenfalls nur eine Liquorsequenz vor – diese sticht durch das fast vollständige Fehlen des Teilabschnitts d hervor (Abb. 22). Andere Teilabschnitte wie e sind vollständig dupliziert, bei c wird eine Duplikation eines verkürzten Teilstücks erkannt. Die vorliegende Sequenz lautet in ihrer Abfolge: a (vollständig: 1-25), b (vollständig: 1-23), c (erste 31 bp), e (vollständig: 1-18), f (erste 12 bp), c (Teilstück: 13-31; insgesamt 19 bp), d (letzte 3 bp), e (vollständig: 1-18), f (fehlende Base A+G an Position 19+20; sonst vollständig: 1-69).

Patient 13:



Abb. 23: Schematische Darstellung der Consensussequenz im Liquor von Patient 13 in Bezug auf die JCV-Archetyp-Gliederung. Die Buchstaben sowie Nummern in Klammern beziehen sich auf das Gliederungs- und Nummerierungsschema des JCV-Archetyps. Sie geben an, welche Basen bzw. Nukleotide des JCV-Archetyps in dieser Sequenz enthalten sind und ob das entsprechende Teilstück in seiner ursprüngliche Länge vorhanden oder verkürzt ist; # = Patient, CSF = Cerebrospinal fluid (Liquor), ORI = origin of replication (umfasst 12 bp), * = Punktmutation.

Die im Liquor gefundene Consensussequenz von Patient 13 ist in Abb. 23 dargestellt und zeigt das typische Bild der sich wiederholenden/duplizierten Teilabschnitte von Teilstück c und e – insbesondere der Teilabschnitt e sticht hier hervor, da er dreimal in der Sequenz um 3 bp von seiner ursprünglichen Form verkürzt vorkommt. Die detaillierte Sequenz sieht folgendermaßen aus: a (vollständig: 1-25), b (vollständig: 1-23), c (erste 39 bp), e (erste 3 bp fehlen, sonst vollständig: 4-18), c (Teilstück: 34-39; insgesamt: 6 bp), e (erste 3 bp fehlen, sonst vollständig: 4-18), b (Punktmutation an Position 1 (T->G), sonst vollständig: 1-23), c (erste 39 bp), e (erste 3 bp fehlen, sonst vollständig: 4-18), f (vollständig: 1-69). Auch bei dieser Sequenz fehlt der Teilabschnitt d komplett; ebenso tritt Teilabschnitt c und e stets verkürzt auf (c um 16 bp verkürzt, e um 3 bp verkürzt).

Patient 14:



Abb. 24: Schematische Darstellung der Consensussequenz im Serum von Patient 14 in Bezug auf die JCV-Archetyp-Gliederung. Die Buchstaben sowie Nummern in Klammern beziehen sich auf das Gliederungs- und Nummerierungsschema des JCV-Archetyps. Sie geben

an, welche Basen bzw. Nukleotide des JCV-Archetyps in dieser Sequenz enthalten sind und ob das entsprechende Teilstück in seiner ursprüngliche Länge vorhanden oder verkürzt ist; # = Patient, S = Serum (Serum), ORI = origin of replication (umfasst 12 bp), ▼ = zusätzliche Base.

Auch bei der Consensussequenz, die im Serum von Patient 14 gefunden wurde, fehlt der Teilabschnitt d vollständig (siehe Abb. 24). Teilabschnitt c und e sind beide dupliziert, wobei der zweite Teilabschnitt c verkürzt ist. Ebenso findet sich eine Insertion von 4 bp zwischen dem Teilabschnitt e und dem duplizierten Teilstück c, dessen Ursprung (also von welchem Teilabschnitt es stammt) nicht klar definierbar ist. Der Aufbau der Sequenz sieht wie folgt aus: a (vollständig: 1-25), b (vollständig: 1-23), c (vollständig: 1-55), e (vollständig: 1-18), Insertion von 4 bp (GGAT -> potenziell letzte Base von b und erste 3 Basen von c), c (letzte 25 bp), e (vollständig: 1-18), f (vollständig: 1-69).

Patient 15:



Abb. 25: Schematische Darstellung der Consensussequenz im Serum von Patient 15 in Bezug auf die JCV-Archetyp-Gliederung. Die Buchstaben sowie Nummern in Klammern beziehen sich auf das Gliederungs- und Nummerierungsschema des JCV-Archetyps. Sie geben an, welche Basen bzw. Nukleotide des JCV-Archetyps in dieser Sequenz enthalten sind und ob das entsprechende Teilstück in seiner ursprüngliche Länge vorhanden oder verkürzt ist; # = Patient, S = Serum (Serum), ORI = origin of replication (umfasst 12 bp), \star = Punktmutation.

Bei dieser Serum-Sequenz von Patient 15 (dargestellt in Abb. 25) zeigen sich, abgesehen von einzelnen Punktmutationen in Teilabschnitten b und f, größere Unterschiede hinsichtlich Deletionen und Rearrangments nur bei Teilabschnitt d, bei dem ein 24 bp langes Mittelstück fehlt. Ansonsten ist dieser Teil unverändert, keinerlei Einzelnukleotidmutationen. Die Abfolge der Teilstücke ist folgendermaßen: a (vollständig: 1-25), b (Punktmutation an Position 14 (G->A), sonst vollständig: 1-23), c (vollständig: 1-55), d (erste 26 bp sowie letzte 16 bp; Teilstück 27-50 fehlt), e (vollständig: 1-18), f (Punktmutation an Position 41 (G->C), sonst vollständig: 1-69). Die Ähnlichkeit zum Archetyp bzw. zu dessen grundsätzlichem Aufbau ist klar zu erkennen.

Patient 16:



Abb. 26: schematische Darstellung der Consensussequenz im Serum von Patient 16 in Bezug auf die JCV-Archetyp-Gliederung. Die Buchstaben sowie Nummern in Klammern beziehen sich auf das Gliederungs- und Nummerierungsschema des JCV-Archetyps. Sie geben an, welche Basen bzw. Nukleotide des JCV-Archetyps in dieser Sequenz enthalten sind und ob das entsprechende Teilstück in seiner ursprüngliche Länge vorhanden oder verkürzt ist; # = Patient, S = Serum (Serum), ORI = origin of replication (umfasst 12 bp).

Die letzte analysierte Sequenz ist die im Serum von Patient 16 gefundene Consensussequenz (Abb. 26). Sie weist die Gliederung und den Aufbau des Archetyps auf und ist damit die einzige Sequenz in dem untersuchten Kollektiv, die keine Abweichung vom ursprünglichen Archetyp aufweist.

3.1.5 Erläuterung und Vergleich der gefundenen Consensussequenzen

Die analysierten Sanger-Consensussequenzen des untersuchten Kollektivs von 16 Patienten zeigen eine sehr hohe Diversität in der *Non-Coding-Control-Region*. Insgesamt lassen sich 19 verschiedene Sequenzen finden - die Varianten mit gleicher Consensussequenz in Liquor und Serum bei einem Probenpaar werden einzeln gezählt (da bei insgesamt 7 der 10 Paare übereinstimmende Consensussequenzen gefunden wurden, reduziert sich die Anzahl der Sequenzen von 26 auf 19).

Die Länge und Abfolge der unterschiedlichen Teilabschnitte (bezogen auf den Archetyp) variiert sehr stark. Grundsätzlich lässt sich festhalten, dass jede gefundene Patientensequenz mit den Teilabschnitten ori, a und b beginnt und mit dem Teilabschnitt f endet. Der origin of replication war bei allen Sequenzen unverändert (in Bezug auf den Archetyp) vorhanden. Auffallend wenig Veränderungen jeglicher Art (Deletionen, Insertionen, Punktmutationen) zeigen sich in Teilabschnitt a, lediglich bei #11 konnte man im Liquor ein um 4 bp verkürztes "a" feststellen. Bei Teilabschnitt b hingegen findet man bei 5 der 19 Sequenzvarianten Unterschiede – teilweise sind diese verkürzt (# 1 im CSF, #9 und #10 im CSF/S), teilweise weisen sie Punktmutationen auf (#11 im CSF, #15 im S). Bei allen gefundenen Sequenzen folgt auf den ersten sowie auf den potentiell duplizierten Teilabschnitt b immer der Teilabschnitt c, der allerdings variablere Ausprägungen aufzeigt. Dieser ist meist stark verkürzt (im Vergleich zum Archetyp-Teilabschnitt c) und einzelne Basen wurden deletiert oder insertiert. Bei 17 der 19 gefundenen NCCR-Varianten liegt entweder der vollständige Teilabschnitt c oder ein verkürztes Stück davon dupliziert bzw. tripliziert vor (dann allerdings nicht direkt hinter dem ersten Teilabschnitt c eingefügt, sondern an anderer Stelle). In der überwiegenden Zahl der Fälle wird die in der Sequenz auftretende Variante von "c" exakt gleich dupliziert (z.B. bei #8 c (1-33)) – auch mit den jeweiligen Einzelnukleotidveränderungen (siehe #2 S). Abweichungen von diesem Muster sind bei #1 S, #3 S, #9 CSF/S, #11 - #13 CSF, #14 S erkennbar. Meist liegen hierbei insgesamt 3 Teilstücke von "c" vor - zwei sind exakt gleich, das dritte ist verschieden.

Auf jeden Teilabschnitt c, unabhängig davon, ob es der erste oder der duplizierte Teilabschnitt c ist, folgt immer entweder der Teilabschnitt d oder e.

Am häufigsten können Unterschiede, partielle oder vollständige Deletionen des Teilabschnitts d festgestellt werden. Bei den insgesamt 19 Sequenzen fehlt bei 7 Sequenzen der Teilabschnitt d vollständig, bei 2 sind lediglich die letzten 3 bp enthalten. Bei einer Sequenz (S #16) ist Teilabschnitt d unverändert enthalten, bei # 15 detektiert man lediglich Teilabschnitt d mit einem 24 bp langen fehlenden Mittelstück. Bei den restlichen 8 Sequenzen ist in der Regel ein verkürzter Teilabschnitt d enthalten – dieser liegt in gleicher oder ähnlicher Form dupliziert bzw. verdreifacht in der jeweiligen Sequenz vor. Somit ist "d" der hypervariabelste Teilabschnitt der NCCR.

Das Teilstück e ist in 16 der 19 Sequenzvarianten dupliziert bzw. tripliziert und an anderer Stelle eingefügt – ähnlich wie bei Teilabschnitt c. Es weist als Veränderungen entweder Deletionen von mehreren Basenpaaren auf (bei 5 Sequenzen) oder Punktmutationen/Einzelnukleotidveränderungen (ebenfalls bei 5 Sequenzen). Auf das Teilstück e folgt in der Regel entweder das Teilstück b oder f (Ausnahmen sind bei # 8 CSF/S, #11 CSF, #13 CSF und #14 S).

Jede der gefundenen Sequenzen endet mit dem Teilabschnitt f (meist in vollständiger Länge, allerdings mit Einzelnukleotidveränderungen), wobei in einigen Varianten ein verkürztes, dupliziertes Teilstück, was in der Mitte der Sequenz eingefügt wurde, zu finden ist. Dies tritt allerdings nicht in der Regelmäßigkeit auf wie bei Teilabschnitt c und e. Bezüglich der Länge der Sequenzen in Bezug auf den Archetyp (gemessen in Basenpaaren) lässt sich sagen, dass kein einheitlicher Trend feststellbar ist. 10/19 Sequenzen waren länger als der Archetyp, 8 kürzer und eine war wie der Archetyp aufgebaut und zeigte somit keine Längenunterschiede.

Bei 7 der 10 Liquor-Serum-Paare fand man eine übereinstimmende Consensussequenz, bei 3 der 10 wurden unterschiedliche Sequenzen im Liquor und Serum gefunden. Bei Patient #1 und #2 konnte keine konkrete Ähnlichkeit zwischen den Sequenzen der beiden Körperflüssigkeiten festgestellt werden – bei #3 hingegen war dies möglich, hier war lediglich ein Teilabschnitt (der 2. Teilabschnitt c) leicht verändert.

In einer Patientenprobe konnte der unveränderte Archetyp detektiert werden (Serum bei #16), bei einer anderen Patientenprobe war die Consensussequenz dem ursprünglichen Archetyp sehr ähnlich (Serum bei #15).

3.1.6 Zusammenfassung der Analyse mittels Sangersequenzierung

In der vorliegenden Untersuchung (10 Liquor-Serum-Paare, 3 Einzelliquorproben, 3 Einzelserumproben) konnten 19 verschiedene Varianten der NCC-Region des JC-Virus von insgesamt 16 unterschiedlichen PML-Patienten gefunden werden. Bei insgesamt 10 vorhandenen Liquor-Serum-Paaren zeigte sich bei 3 dieser 10 eine unterschiedliche Consensussequenz im Liquor bzw. Serum, bei 7 war diese in beiden Körperflüssigkeiten identisch.

Es zeigt sich ein sehr buntes und variables Bild an NCC-Regionen, wobei einige Trends bei fast allen Sequenzen wiederzuerkennen sind. Dazu zählen die durchweg gleichen Teilabschnitte, mit denen eine NCCR-Sequenz beginnt (a+b) und endet (f). Auf einen bestimmten Teilabschnitt folgen meist ein oder zwei spezifische andere Teilabschnitte. Viele *Rearrangements*, Duplikationen und Insertionen wurden bei den Teilabschnitten c und e gefunden. Der Bereich mit den meisten Veränderungen (insbesondere in Hinblick auf das vollständige Fehlen dieses Teilabschnitts) war "d". Teilabschnitt a, b und f waren im Gegensatz zu den anderen 3 Abschnitten am wenigsten und am seltensten in Bezug auf die Archetypsequenz verändert. Abgesehen von Teilabschnitt d waren alle anderen Teilabschnitte, wenn auch verkürzt, in jeder Sequenz immer vorhanden. Der *origin of replication* (ori) lag bei allen Sequenzen in Bezug auf den Archetyp unverändert vor.

Längentechnisch zeigt sich kein klarer Trend.

In der folgenden Abb. 27 sind alle in dieser Untersuchung gefundenen und analysierten Consensussequenzen abgebildet und zu den bereits vorher festgesetzten Gruppen zugeordnet (ungleiche Liquor-Serum-Sequenzen, gleiche Liquor-Serum-Sequenzen, Einzelsequenzen). Zusätzlich sind der Archetyp und der MAD1 zum besseren Aufbau- und Längenvergleich mitaufgeführt.



Abb. 27: Schematische Darstellung des JCV-Archetyps und des PML-Typs MAD1 sowie der Consensussequenzen im Liquor und Serum von Patient 1-16 in Bezug auf die JCV-Archetyp-Gliederung. Die Buchstaben sowie Nummern in Klammern beziehen sich auf das Gliederungs- und Nummerierungsschema des JCV-Archetyps. Sie geben an, welche Basen bzw. Nukleotide des JCV-Archetyps in dieser Sequenz enthalten sind und ob das entsprechende Teilstück in seiner ursprüngliche Länge vorhanden oder verkürzt ist;

= Patient, CSF = Cerebrospinal fluid (Liquor), S = Serum (Serum), ORI = origin of replication (umfasst 12 bp), \bullet = fehlende Base, \star = Punktmutation, \vee = zusätzliche Base.

3.2 Tiefensequenzierung der Liquor- und Serumproben

3.2.1 Hintergrund der Untersuchung

Nach der Bestimmung der Consensussequenzen im Liquor bzw. Serum der 16 Patienten mit diagnostizierter PML wurde der Fokus auf potenzielle Minorvarianten bzw. Quasispezies gelegt. Quasispezies sind verschiedene Varianten, die gleichzeitig neben der dominierenden Consensussequenz in demselben Wirt (hier dem gleichen Patienten) auftreten. Die Tiefensequenzierung ermöglicht die Fokussierung auf die in der jeweiligen Liquor- und Serumprobe gefundenen Quasispezies. Gerade im Hinblick auf die 3 Liquor-Serum-Paare von demselben Patienten, bei denen unterschiedliche Consensussequenzen in Liquor und Serum gefunden wurden, war diese Fragestellung interessant – es wurde insbesondere untersucht, ob die in dem entsprechenden Körpermaterial (Liquor bzw. Serum) gefundene Consensussequenz als Quasispezies/Minorvariante in der jeweiligen korrespondierenden Probe (Serum bzw. Liquor) zu finden war. Weiterhin zielte die Fragestellung darauf ab, ob die aufgetretenen Varianten im Liquor und Serum (beim gleichen Patienten) identisch bzw. sehr ähnlich (bis auf einzelne Punktmutationen übereinstimmend) sind.

Ergebnisse zu diesen Fragestellungen können Aufschluss über die Entstehung der PML und dem Zusammenhang zwischen dem im Serum und im Liquor gefundenen JC-Virus geben – entstehen *Rearrangements* nur im Serum und "wandern" sie ähnlich wie die im Liquor dominierende Variante in das Gehirn und fortschreitend auch in den Liquor aus? Oder läuft der Prozess der *Rearrangements* und das Entstehen neuer, potenziell virulenter Quasispezies auch im Gehirn/Liquor ab?

3.2.2 Einteilung und Anzahl der gefundenen Minorvarianten

Um diesen Fragestellungen nachzugehen, wurde eine Tiefensequenzierung bei den 26 vorliegenden Proben durchgeführt. Die 10 am häufigsten gefundenen Varianten wurden gegen den Archetyp bzw. die Consensussequenz ausgerichtet. In Tabelle 12 ist jeweils die Anzahl der in der Liquor- bzw. Serumprobe gefundenen Quasispezies aufgelistet – weiterhin sind diese Quasispezies, abhängig vom Grad der Veränderung zu der jeweiligen Consensussequenz, in zwei Gruppen aufgeteilt. Auf der einen Seite werden Varianten mit größeren *Rearrangements* (Deletionen/Insertionen) gelistet, die dementsprechend auch einen Längenunterschied zur Majorvariante aufweisen, auf der anderen nur jene mit einzelnen Punktmutationen, einzelnen zusätzlichen bzw. fehlenden Basenpaaren – die Grundstruktur der Consensussequenz ist hier aber erhalten.

Bei 23 der 26 untersuchten Proben konnte mindestens eine Minorvariante gefunden werden, lediglich bei 2 der 23 Sequenzen mit Quasispezies waren es nur Varianten mit kleineren Basenveränderungen. Dementsprechend wurde bei 21 Proben mindestens eine zur Consensussequenz stärker veränderte Variante gefunden. Wie diese Veränderungen im Detail aussehen und inwiefern sich die Minorvarianten bei einem Probenpaar unterscheiden, wird nun näher erläutert.

Patienten-	Probenmaterial	Anzahl der	Anzahl der	Anzahl der
nummer	(CSF/S)	Quasispezies	Quasispezies mit	Quasispezies mit
(#)		(gesamt)	Rearrangements	kleineren
				Veränderungen ^a
1	CSF	3	2	1
1	S	-	-	-
2	CSF	1	1	-
2	S	3	1	2
3	CSF	3	3	-
3	S	1	1	-
4	CSF	1	1	-
4	S	1	1	-
5	CSF	4	3	1
5	S	2	2	-
6	CSF	2	1	1
6	S	2	1	1
7	CSF	6	1	5
7	S	5	1	4
8	CSF	2	2	-
8	S	3	3	-
9	CSF	1	1	-
9	S	2	1	1
10	CSF	3	1	2
10	S	1	1	-
11	CSF	5	4	1
12	CSF	-	-	-
13	CSF	1	1	-
14	S	1	-	1
15	S	2	-	2
16	S	-	-	-

Tabelle 12: Darstellung der Ergebnisse der Tiefensequenzierung bei den 26 Proben (10 Probenpaare, 6 Einzelproben) aufgelistet nach Patientennummer (#). Es erfolgt eine Aufteilung in *CSF-(cerebrospinal fluid* = Liquor) und *S- (Serum*= Serum)proben. Alle in der Probe gefundenen Minorvarianten/Quasispezies werden in Spalte 3 aufgelistet. In Spalte 4 und 5 erfolgt eine Einteilung dieser Minorvarianten in zwei Unterkategorien – Quasispezies mit größeren Veränderungen (Deletionen/Insertionen/Duplikationen von Teilstücken) im Vergleich zur zugehörigen Consensussequenz sowie Quasispezies mit kleineren Veränderungen. a – hiermit sind Einzelnukleotidveränderungen, Punktmutationen sowie einzelne fehlende bzw. zusätzliche Basen im Vergleich zur Consensussequenz gemeint.

3.2.3 Beschreibung der gefundenen Varianten im Vergleich zur Consensussequenz

Im Folgenden werden die in der jeweiligen Probe gefundenen Quasispezies in Hinblick auf die dazugehörige Consensussequenz näher analysiert. Die Quasispezies sind – ähnlich wie die Sangersequenzen im vorherigen Kapitel – gemeinsam mit der Majorvariante schematisch abgebildet, sodass schneller ein übersichtlicher Vergleich zwischen den Minorvarianten zur Majorvariante, aber auch zwischen den Minorvarianten untereinander möglich ist. An dieser Stelle ist zu sagen, dass die in der Sangersequenzierung detektierte Consensussequenz (Majorvariante) mit der in der Tiefensequenzierung gefundenen Majorvariante in allen untersuchten Proben übereinstimmte – die jeweiligen Basenabfolgen waren also kongruent.

Patient 1:



Abb. 28: Schematische Darstellung der Majorvariante sowie der gefundenen Minorvarianten im Liquor von Patient 1. Die Buchstaben sowie Nummern in Klammern beziehen sich auf das Gliederungs- und Nummerierungsschema des JCV-Archetyps. Sie geben an, welche Basen bzw. Nukleotide des JCV-Archetyps in dieser Sequenz enthalten sind und ob das entsprechende Teilstück in seiner ursprüngliche Länge vorhanden oder verkürzt ist; # = Patient, CSF = Cerebrospinal fluid (Liquor), Majorvariante = Consensussequenz; Minorvariante = Quasispezies; ORI = origin of replication (umfasst 12 bp), \star = Punktmutation.

Variante/	Mengenanteil in %
Quasispezies	
CSF-Majorvariante	86,62
CSF-Minorvariante 1	5,17
CSF-Minorvariante 2	4,81
CSF-Minorvariante 3	3,39

Tabelle 13: Anteile der Major- und Minorvarianten in der Liquorprobe von Patient 1. Die Werte sind in Prozent angegeben und wurden in der Analyse der Tiefensequenzierung bestimmt;

CSF = Cerebrospinal fluid (Liquor), Majorvariante = Consensussequenz; Minorvariante = Quasispezies.

Bei Patient 1 wurden nur im Liquor Quasispezies zur korrespondierenden Majorvariante gefunden (dargestellt in Abb. 28, prozentuale Verteilung der Liquor-Major-und Minorvarianten in Tabelle 13). Bei 2 der 3 Varianten konnten größere *Rearrangements* festgestellt werden – die eine Variante ist deutlich kürzer als die Consensussequenz (um 120 bp kürzer), die andere hingegen deutlich länger (um 120 bp länger). Bei der ersten Minorvariante wurde das 120bp-lange Stück, das in dieser Form in der Majorvariante vorkommt, bestehend aus den Teilabschnitten f (1-8), b (11-23), c (vollständig: 1-55), d (1-25), d (66) sowie e (vollständig: 1-18) deletiert, bei der zweiten Minorvariante hingegen dupliziert.

Die genaue Abfolge der 1. Minorvariante lautet somit: a (vollständig: 1-25), b (erste 12 bp enthalten), c (letzte 41 bp), d (erste 25 bp), d (letzte/66. Base), e (vollständig: 1-18), f (vollständig: 1-69).

Die Abfolge der zweiten Minorvariante ist somit wie folgt: a (vollständig: 1-25), b (erste 12 bp enthalten), c (letzte 41 bp), d (erste 25 bp), d (letzte/66. Base), e (vollständig: 1-18), f (erste 8 bp), b (letzte 13 bp), c (vollständig: 1-55), d (erste 25 bp), d (letzte/66. Base), e (vollständig: 1-18), f (erste 8 bp), b (letzte 13 bp), c (vollständig: 1-55), d (erste 25 bp), d (letzte/66. Base), e (vollständig: 1-18), f (vollständig: 1-18), f (erste 8 bp), b (letzte 13 bp), c (vollständig: 1-55), d (erste 25 bp), d (letzte/66. Base), e (vollständig: 1-18), f (vollständig: 1-56), d (erste 25 bp), d (letzte/66. Base), e (vollständig: 1-18), f (vollständig: 1-56), d (erste 25 bp), d (letzte/66. Base), e (vollständig: 1-18), f (vollständig: 1-69).

Die dritte Minorvariante hingegen weist nur eine einzelne Punktmutation im ersten Teilabschnitt d an Position 21 auf, an der die Base Guanin durch ein Adenin ersetzt wurde. Ansonsten ist diese Variante identisch zur Consensussequenz.

Da zu diesem Patienten durch die Tiefensequenzierung keine Minorvarianten im Serum detektiert wurden, ist zur Vergleichbarkeit noch einmal das Ergebnis der Sangersequenzierung dargestellt (siehe Abb. 29).



Abb. 29: Schematische Darstellung der Liquor- und Serumsequenz von Patient 1 in Bezug auf die JCV-Archetyp-Gliederung ermittelt durch die Sangersequenzierung. Die Buchstaben sowie Nummern in Klammern beziehen sich auf das Gliederungs- und Nummerierungsschema des JCV-Archetyps. Sie geben an, welche Basen bzw. Nukleotide des JCV-Archetyps in dieser Sequenz enthalten sind und ob das entsprechende Teilstück in seiner ursprünglichen Länge vorhanden oder verkürzt ist;

= Patient, CSF = Cerebrospinal fluid (Liquor), S = Serum (Serum), ORI = origin of replication (umfasst 12 bp), • = fehlende Base

Wie man anhand der obigen Sequenzabfolge sehen kann, besteht seitens der 3 im Liquor gefundenen Minorvarianten keine Ähnlichkeit zur Serum-Consensussequenz – eher lassen sich diese durch Duplikations- und Deletionsprozesse aus der Liquor-Majorvariante ableiten.

Patient 2:



Abb. 30: Schematische Darstellung der Majorvarianten sowie der gefundenen Minorvarianten im Liquor und Serum von Patient 2. Die Buchstaben sowie Nummern in Klammern beziehen sich auf das Gliederungs- und Nummerierungsschema des JCV-Archetyps. Sie geben an, welche Basen bzw. Nukleotide des JCV-Archetyps in dieser Sequenz enthalten sind und ob das entsprechende Teilstück in seiner ursprüngliche Länge vorhanden oder verkürzt ist;

= Patient, CSF = Cerebrospinal fluid (Liquor), S = Serum (Serum), Majorvariante = Consensussequenz; Minorvariante = Quasispezies; ORI = origin of replication (umfasst 12 bp),
 = fehlende Base, ★= Punktmutation.

Mengenanteil in %
99,34
0,66
90,0
3,57
4,71
1,7

Tabelle 14: Anteile der Major- und Minorvarianten in der Liquor- und Serumprobe vonPatient 2. Die Werte sind in Prozent angegeben und wurden in der Analyse derTiefensequenzierung bestimmt;

CSF = *Cerebrospinal fluid* (Liquor), S = *Serum* (Serum), Majorvariante = Consensussequenz; Minorvariante = Quasispezies.

Sowohl im Serum als auch im Liquor des zweiten Patienten konnten Quasispezies gefunden werden – im Liquor lediglich eine, im Vergleich zur Consensussequenz verkürzte Variante, im Serum drei, wobei eine Variante ebenfalls eine Deletion im Vergleich zu der dort existierenden Majorvariante aufweist und die beiden anderen einzelne Punktmutationen zeigen, sonst aber identisch mit der Consensussequenz sind (siehe hierzu Abb. 30 und Tabelle 14).

In der Minorvariante im Liquor fehlen folgende Teilabschnitte: c (1-27), d (59-66), e (1-15), b (14-23). Somit lautet die gefundene Variante wie folgt: a (vollständig: 1-25), b (vollständig: 1-23), c (erste 27 bp enthalten), d (letzte 8 bp), e (vollständig: 1-18), d (letzte 14 bp), e (vollständig: 1-18), f (vollständig: 1-69). Die Minorvariante ist also um 60 bp kürzer als die dazugehörige Majorvariante.

Die im Serum gefundene Variante ist ebenfalls verkürzt im Vergleich zu der dortigen Consensussequenz. Hier fehlen die Teilabschnitte c (vollständig: 1-55; mit der fehlenden Base an Position 35), e (vollständig: 1-18 mit Punktmutationen an den Positionen 3, 4 und 5), f (1-12) sowie b (23). Durch diese Deletionen von sämtlichen Teilabschnitten ist die Sequenz um 85 bp verkürzt und ist folgendermaßen aufgebaut: a (vollständig: 1-25), b (vollständig: 1-23), c (fehlendes Guanin an Position 35, sonst vollständig: 1-55), e (Punktmutationen an Position 3 (Thymin (T) durch A ersetzt), 4 (A->G) und 5 (A-->G), sonst vollständig: 1-18), f (vollständig: 1-69).

Die beiden anderen im Serum des zweiten Patienten gefundenen Quasispezies weisen lediglich Punktmutationen im Vergleich zur Majorvariante auf – die erste Variante im vollständigen Teilabschnitt f, die zweite im ersten Teilabschnitt e. Bei der einen Variante ist die Base an Position 1 im Teilabschnitt f Guanin gegen Thymin getauscht, bei der anderen findet sich im ersten Teilabschnitt e eine Punktmutation an Position 17, wobei Guanin durch Thymin ersetzt wurde. Die sonst auch in der Majorvariante vorkommenden Basen/Nukleotidveränderungen in Teilabschnitt c und e sind auch bei diesen beiden Quasispezies nachweisbar.

Patient 3:



Abb. 31: Schematische Darstellung der Majorvarianten sowie der gefundenen Minorvarianten im Liquor und Serum von Patient 3. Die Buchstaben sowie Nummern in Klammern beziehen sich auf das Gliederungs- und Nummerierungsschema des JCV-Archetyps. Sie geben an, welche Basen bzw. Nukleotide des JCV-Archetyps in dieser Sequenz enthalten sind und ob das entsprechende Teilstück in seiner ursprüngliche Länge vorhanden oder verkürzt ist;

= Patient, CSF = Cerebrospinal fluid (Liquor), S = Serum (Serum), Majorvariante = Consensussequenz; Minorvariante = Quasispezies; ORI = origin of replication (umfasst 12 bp).

Variante/	Mengenanteil in %
Quasispezies	
CSF-Majorvariante	53,73
CSF-Minorvariante 1	35,3
CSF-Minorvariante 2	7,37
CSF-Minorvariante 3	3,6
S-Majorvariante	99,33
S-Minorvariante 1	0,67

Tabelle 15: Anteile der Major- und Minorvarianten in der Liquor- und Serumprobe vonPatient 3. Die Werte sind in Prozent angegeben und wurden in der Analyse derTiefensequenzierung bestimmt;

CSF = Cerebrospinal fluid (Liquor), S = Serum (Serum), Majorvariante = Consensussequenz; Minorvariante = Quasispezies.

Obwohl bei Patient 3 ebenfalls eine unterschiedliche Consensussequenz im Liquor und Serum gefunden wurde – genau wie bei den Patienten 1 und 2 – wies dieses Liquor-Serum-Paar dennoch eine Besonderheit auf. Hier war nämlich die Majorvariante im Serum als Minorvariante im Liquor nachweisbar. Im Liquor ließen sich 3 Quasispezies finden – alle drei kürzer als die entsprechende Consensussequenz, weil sie unterschiedliche Deletionen aufwiesen. Im Serum hingegen fand sich nur eine weitere Minorvariante, die auch kürzer als die korrespondierende Majorvariante war (Abb. 31) In Tabelle 15 sind die in der Tiefensequenzierung gemessenen Häufigkeitsverteilungen der Major- und Minorvarianten gezeigt.

Die erste im Liquor untersuchte Sequenz wies die gleiche Abfolge wie die im Serum gefundene Consensussequenz auf: a (vollständig: 1-25), b (vollständig: 1-23), c (vollständig: 1-55), d (erste 4 bp), d (letzte 7 bp), e (vollständig: 1-18), b (letzte 10 bp), c (erste 31 bp), c (letzte 11 bp), d (erste 4 bp), d (letzte 7 bp), e (vollständig: 1-18), f (vollständig: 1-69).

Die zweite Minorvariante entstand durch größere Deletionen von Teilabschnitten aus der Majorvariante und war somit um 94 bp kürzer. Hier wurden die Teilstücke b (14-23), c (1-55), d (1-4; 60-66) und e (1-18) entfernt, sodass letztendlich die Sequenz der Minorvariante 2 lautet: : a (vollständig: 1-25), b (vollständig: 1-23), c (vollständig: 1-55), d (erste 4 bp), d (letzte 7 bp), e (vollständig: 1-18), f (vollständig: 1-69).

Bei der dritten Minorvariante hingegen fanden sich auch Deletionen, aber nicht in so großem Umfang wie bei Minorvariante 2 – die Sequenz war lediglich um 33 bp kürzer als die korrespondierende Consensussequenz. Hier fehlten lediglich ein Stück des vollständigen Teilabschnitts c (letzte 22 bp wurden deletiert) sowie das duplizierte Teilstück von Teilabschnitt d (1-4; 60-66). Somit lautete die Abfolge der Teilabschnitte folgendermaßen: a (vollständig: 1-25), b (vollständig: 1-23), c (vollständig: 1-55), d (erste 4 bp), d (letzte 7 bp), e (vollständig: 1-18), b (letzte 10 bp), c (erste 33 bp), e (vollständig: 1-18), f (vollständig: 1-69).

Die im Serum gefundene Quasispezies wies sehr große Ähnlichkeiten zur zweiten Liquor-Minorvariante auf. Lediglich in Teilabschnitt c gab es den gleichen Unterschied wie auch bei den Majorvarianten von Liquor und Serum. Während im Liquor der Teilabschnitt c vollständig vorkam, fehlten im Serum die Basenpaare 32-44. Die Abfolge der Serumminorvariante war dementsprechend wie folgt: a (vollständig: 1-25), b (vollständig: 1-23), c (erste 31 bp), c (letzte 11 bp), d (erste 4 bp), d (letzte 7 bp), e (vollständig: 1-18), f (vollständig: 1-69). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich durch die spezifischen Sequenzblockabfolgen mit den entsprechenden Deletionen und Duplikationen eine "Verwandtschaft" zwischen den Majorvarianten von Serum und Liquor, der 2. Liquorminorvariante und der Serumminorvariante feststellen lässt.

Das sich hier ergebende Bild der Quasispezies zeigte sehr eindrucksvoll das wiederholte Auftreten der gleichen *Rearrangements*, Duplikationen bzw. Deletionen auf.

Im weiteren Verlauf dieses Kapitels werden nun die Quasispezies der Liquor-Serum-Paare untersucht, bei denen eine identische Consensussequenz gefunden wurde. Bei allen Paaren fand sich mindestens eine Quasispezies, die sowohl im Liquor, als auch im Serum nachgewiesen werden konnte – bei einigen war es auch mehr als eine übereinstimmende Quasispezies. Bei mehreren Patienten fanden sich aber unabhängig davon noch weitere Minorvarianten, die entweder nur im Liquor oder nur im Serum zu finden waren.

Patient 4:



Abb. 32: Schematische Darstellung der Majorvariante sowie der gefundenen Minorvariante im Liquor und Serum von Patient 4. Die Buchstaben sowie Nummern in Klammern beziehen sich auf das Gliederungs- und Nummerierungsschema des JCV-Archetyps. Sie geben an, welche Basen bzw. Nukleotide des JCV-Archetyps in dieser Sequenz enthalten sind und ob das entsprechende Teilstück in seiner ursprüngliche Länge vorhanden oder verkürzt ist;

= Patient, CSF = Cerebrospinal fluid (Liquor), S = Serum (Serum), Majorvariante = Consensussequenz; Minorvariante = Quasispezies; ORI = origin of replication (umfasst 12 bp), • = fehlende Base, \star = Punktmutation.

Variante/	Mengenanteil in %
Quasispezies	
CSF-Majorvariante	94,61
CSF-Minorvariante ${f 1}$	5,39
S-Majorvariante	95,39
S-Minorvariante 1	4,61

Tabelle 16: Anteile der Major- und Minorvarianten in der Liquor- und Serumprobe vonPatient 4. Die Werte sind in Prozent angegeben und wurden in der Analyse derTiefensequenzierung bestimmt;

CSF = Cerebrospinal fluid (Liquor), S = Serum (Serum), Majorvariante = Consensussequenz; Minorvariante = Quasispezies.

Bei Patient 4 konnte nur eine Minorvariante nachgewiesen werden, die im Liquor wie auch im Serum vorkam und um 85 bp kürzer als die Majorvariante war – diese ist mit der entsprechenden Major-Variante in Abb. 32 dargestellt. Hier wurde ein Teilabschnitt c, e, das Teilstück f sowie das einzelne Basenpaar von b deletiert. Die verkürzte Sequenz baute sich wie folgt auf: a (vollständig: 1-25), b (vollständig: 1-23), c (fehlendes G an Position 35, sonst vollständig: 1-55), e (Punktmutationen an Position 3 (T-->A), 4 (A-->G) und 5 (A-->G), sonst vollständig: 1-18), f (vollständig: 1-69). In Tabelle 16 findet man die prozentuale Verteilung der Majorvarianten mit den zugehörigen Quasispezies.

Patient 5:



Abb. 33: Schematische Darstellung der Majorvariante sowie der gefundenen Minorvarianten im Liquor und Serum von Patient 5. Die Buchstaben sowie Nummern in Klammern beziehen sich auf das Gliederungs- und Nummerierungsschema des JCV-Archetyps. Sie geben an, welche Basen bzw. Nukleotide des JCV-Archetyps in dieser Sequenz enthalten sind und ob das entsprechende Teilstück in seiner ursprüngliche Länge vorhanden oder verkürzt ist;

= Patient, CSF = Cerebrospinal fluid (Liquor), S = Serum (Serum), Majorvariante =
Consensussequenz; Minorvariante = Quasispezies; ORI = origin of replication (umfasst 12 bp),
V = zusätzliche Base, • = fehlende Base.

Variante/	Mengenanteil in %
Quasispezies	
CSF-Majorvariante	58,08
CSF-Minorvariante $\mathbf 1$	10,13
CSF-Minorvariante 2	11,08
CSF-Minorvariante 3	15,28
CSF-Minorvariante 4	5,43
S-Majorvariante	78,13
S-Minorvariante 1	14,17
S-Minorvariante 2	7,11
S-Minorvariante 5	0,58

Tabelle 17: Anteile der Major- und Minorvarianten in der Liquor- und Serumprobe vonPatient 5. Die Werte sind in Prozent angegeben und wurden in der Analyse derTiefensequenzierung bestimmt;

CSF = Cerebrospinal fluid (Liquor), S = Serum (Serum), Majorvariante = Consensussequenz; Minorvariante = Quasispezies. Im Liquor und Serum von Patient 5 konnten insgesamt 5 unterschiedliche Quasispezies gefunden werden, wobei 2 von diesen in beiden Körpermaterialien nachzuweisen waren, 2 ausschließlich im Liquor und eine nur im Serum (siehe Abb. 33 und für die prozentuale Verteilung Tabelle 17).

Die ersten beiden Varianten weisen - ähnlich zu den Quasispezies im Liquor bei Patient 1 zueinander sehr ähnliche Rearrangements auf. Während bei der einen Variante ein Stück der Sequenz, bestehend aus mehreren Teilabschnitten (c, e, f und b), dupliziert wurde und sie somit um 103 bp länger ist als die Majorvariante, wurde dieses bei der zweiten Variante deletiert, sodass sie um 103 bp kürzer im Vergleich zur Majorvariante ist. Die Grundstruktur und die Abfolge der Teilabschnitte im Vergleich zur Consensussequenz ist allerdings bei beiden Strukturen erhalten geblieben – die Nukleotidvarianten, in dieser Sequenz nur zusätzliche Nukleotide, sind in der Form auch in den Minorvarianten erhalten geblieben. Die Abfolge der ersten Quasispezies lautet deswegen: : a (vollständig: 1-25), b (vollständig: 1-23), c (erste 52 bp, zusätzliche Base C zwischen der 49. und 50. Base), e (vollständig: 1-18), f (erste 7 bp), zwei zusätzliche Basen (C+G; Ursprung nicht genau definierbar), b (vollständig: 1-23), c (erste 52 bp, zusätzliche Base C zwischen der 49. und 50. Base), e (vollständig: 1-18), f (erste 7 bp), zwei zusätzliche Basen (C+G; Ursprung nicht genau definierbar), b (vollständig: 1-23), c (erste 52 bp, zusätzliche Base C zwischen der 49. und 50. Base), e (vollständig: 1-18f (vollständig: 1-69). Die zweite hingegen ist folgendermaßen aufgebaut: a (vollständig: 1-25), b (vollständig: 1-23), c (erste 52 bp, zusätzliche Base C zwischen der 49. und 50. Base), e (vollständig: 1-18), f (vollständig: 1-69).

Überdies wurden zwei weitere Varianten im Liquor gefunden, die Veränderungen im duplizierten Teilabschnitt b sowie im 7 bp-langen Teilstück f aufwiesen. Bei einer dieser Quasispezies, also der dritten gefundenen Minorvariante, ist das kurze Teilstück f um 3 bp und das duplizierte Teilstück b um 13 bp verkürzt, sodass die gefundene Sequenz 18 bp kürzer als die zugehörige Consensussequenz war und folgendermaßen lautete: a (vollständig: 1-25), b (vollständig: 1-23), c (erste 52 bp, zusätzliche Base C zwischen der 49. und 50. Base), e (vollständig: 1-18), f (erste 4 bp), b (letzte 10 bp), c (erste 52 bp, zusätzliche Base C zwischen der 49. und 50. Base), e (vollständig: 1-69). Bei der vierten Minorvariante fehlte das kurze Teilstück f komplett und vom Teilabschnitt b sind nur die letzten 3 bp übriggeblieben – insgesamt fehlten 29 bp gegenüber der Liquor-Serum-Consensussequenz. Die Sequenzabfolge konnte folgendermaßen beschrieben werden: a (vollständig: 1-25), b (vollständig: 1-23), c (erste 52 bp, zusätzliche Base C zwischen der 49. und 50. Base), e (vollständig: 1-25), b (vollständig: 1-23), c (erste 52 bp, zusätzliche Base C zwischen der 49. und 50. Base), e (vollständig: 1-25), b (vollständig: 1-23), c (erste 52 bp, zusätzliche Base C zwischen der 49. und 50. Base), e (vollständig: 1-18), f (vollständig: 1-23), c (erste 52 bp, zusätzliche Base C zwischen der 49. und 50. Base), e (vollständig: 1-18), b (letzte 3 bp), c (erste 52 bp, zusätzliche Base C zwischen der 49. und 50. Base), e (vollständig: 1-18), f (vollständig: 1-69).

Im Serum trat neben den bereits am Anfang beschriebenen Varianten, die sowohl im Liquor als auch im Serum gefunden wurde, noch eine weitere Quasispezies auf, bei der allerdings nur ein Nukleotid bzw. die Base Adenin im Teilabschnitt a an der Position 18 fehlte.
Patient 6:



Abb. 34: Schematische Darstellung der Majorvariante sowie der gefundenen Minorvarianten im Liquor und Serum von Patient 6. Die Buchstaben sowie Nummern in Klammern beziehen sich auf das Gliederungs- und Nummerierungsschema des JCV-Archetyps. Sie geben an, welche Basen bzw. Nukleotide des JCV-Archetyps in dieser Sequenz enthalten sind und ob das entsprechende Teilstück in seiner ursprüngliche Länge vorhanden oder verkürzt ist;

= Patient, CSF = Cerebrospinal fluid (Liquor), S = Serum (Serum), Majorvariante = Consensussequenz; Minorvariante = Quasispezies; ORI = origin of replication (umfasst 12 bp),
 e fehlende Base, ★= Punktmutation.

Variante/	Mengenanteil in %	
Quasispezies		
CSF-Majorvariante	89,28	
CSF-Minorvariante 1	8,87	
CSF-Minorvariante 2	1,85	
S-Majorvariante	91,34	
S-Minorvariante 1	4,57	
S-Minorvariante 3	4,08	

Tabelle 18: Anteile der Major- und Minorvarianten in der Liquor- und Serumprobe vonPatient6. Die Werte sind in Prozent angegeben und wurden in der Analyse derTiefensequenzierung bestimmt.

CSF = Cerebrospinal fluid (Liquor), S = Serum (Serum), Majorvariante = Consensussequenz; Minorvariante = Quasispezies.

In den Körpermaterialien des 6. Patienten konnten insgesamt 3 unterschiedliche Quasispezies nachgewiesen werden, wobei eine sowohl im Liquor als auch im Serum vorkam (dargestellt in Abb. 34). Diese wies größere Deletionen auf, insbesondere im Teilabschnitt c und dem kürzeren Teilstück f, sodass sie um insgesamt 85 bp kürzer war. Die genaue Abfolge der Liquor-Serum-Minorvariante lautete: a (vollständig: 1-25), b (vollständig: 1-23), c (fehlendes G an Position 35, sonst vollständig: 1-55), e (Punktmutationen an Position 3 (T-->A), 4 (A-->G) und 5 (A-->G), sonst vollständig: 1-18), f (vollständig: 1-69). Die Nukleotidvarianten in den Teilabschnitten c und e waren bei dieser, wie auch bei den anderen Minorvarianten, in der Form erhalten geblieben, in der sie auch in der Consensussequenz vorkamen.

Bei der zweiten Minorvariante, die nur im Liquor nachgewiesen werden konnte, war der am Ende der Sequenz stehende Teilabschnitt f verkürzt – hier wies die Sequenz eine Deletion der ersten 33 bp des Teilabschnitts f auf, sodass die Gesamtsequenz um 33 verkürzt war gegenüber der Majorvariante: a (vollständig: 1-25), b (vollständig: 1-23), c (fehlendes G an Position 35, sonst vollständig: 1-55), e (Punktmutationen an Position 3 (T->A), 4 (A->G) und 5 (A->G), sonst vollständig: 1-18), f (erste 12 bp), b (letzte Base), c (fehlendes G an Position 35, sonst vollständig: 1-55), e (Punktmutationen an Position 3 (T->A), 4 (A->G) und 5 (A->G), sonst vollständig: 1-18), f (letzte 30 bp).

Im Serum war ebenfalls noch eine weitere Quasispezies, die allerdings nur eine Punktmutation an Position 8 im zweiten vollständigen Teilabschnitt c vorzuweisen hatte. Hier wurde ein Guanin durch ein Adenin ersetzt.

In Tabelle 18 sind die Anteile der Major- und Minorvarianten in Prozent, die im Liquor bzw. Serum von Patient 6 gefunden wurden, dargestellt.



Patient 7:

Abb. 35: Schematische Darstellung der Majorvariante sowie der gefundenen Minorvarianten im Liquor und Serum von Patient 7. Die Buchstaben sowie Nummern in Klammern beziehen sich auf das Gliederungs- und Nummerierungsschema des JCV-Archetyps. Sie geben an, welche Basen bzw. Nukleotide des JCV-Archetyps in dieser Sequenz enthalten sind und ob das entsprechende Teilstück in seiner ursprüngliche Länge vorhanden oder verkürzt ist;

= Patient, CSF = Cerebrospinal fluid (Liquor), S = Serum (Serum), Majorvariante = Consensussequenz; Minorvariante = Quasispezies; ORI = origin of replication (umfasst 12 bp),
 e fehlende Base, ▼ = zusätzliche Base, ★ = Punktmutation.

Variante/	Mengenanteil in %
Quasispezies	
CSF-Majorvariante	88,56
CSF-Minorvariante ${f 1}$	7,53
CSF-Minorvariante 2	0,61
CSF-Minorvariante 3	0,81
CSF-Minorvariante 4	1,04
CSF-Minorvariante 5	0,86
CSF-Minorvariante 6	0,59
S-Majorvariante	89,42
S-Minorvariante ${f 1}$	8,24
S-Minorvariante 2	0,79
S-Minorvariante 3	1,05
S-Minorvariante 7	0,5

Tabelle 19: Anteile der Major- und Minorvarianten in der Liquor- und Serumprobe vonPatient 7. Die Werte sind in Prozent angegeben und wurden in der Analyse derTiefensequenzierung bestimmt.

CSF = Cerebrospinal fluid (Liquor), S = Serum (Serum), Majorvariante = Consensussequenz; Minorvariante = Quasispezies.

Im Liquor und Serum des 7. Patienten wurden auffallend viele Varianten, nämlich 7, gefunden. 4 von diesen konnten in beiden Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden, weitere 2 nur im Liquor und eine einzelne nur im Serum. Die jeweilige Lediglich bei der ersten Minorvariante konnten größere *Rearrangements* bzw. Deletionen nachgewiesen werden, bei den weiteren 6 Varianten fanden sich hingegen nur Einzelnukleotidveränderungen. Diese sind in Abb. 35 gezeigt, die prozentualen Verteilungen der Major-und Minorvarianten in Tabelle 19 dargestellt.

Bei der im Liquor und Serum nachgewiesenen ersten Quasispezies fehlten ein Teilabschnitt c, e und die einzelne letzte Base von b, insgesamt fehlten also 72 Basenpaare. Somit ergab sich folgende Sequenzabfolge: a (vollständig: 1-25), b (vollständig: 1-23), c (vollständig: 1-55), e (fehlendes T und A an Position 3 und 4, sonst vollständig: 1-18), f (erste 17 Basen), f (bis auf erste fehlende Base vollständig: 2-69).

Bei einer weiteren sowohl im Serum als auch im Liquor gefundenen Variante wurde ein zusätzliches Adenin zwischen Position 18 und 19 hinzugefügt (sodass der Teilabschnitt a nun 26 bp lang ist), während eine weitere gefundene Variante lediglich eine fehlende Base (hier Adenin) im Teilabschnitt a an der Position 18 aufwies – hier war a nur noch 24 bp lang.

Zwei weitere Quasispezies, die nur im Liquor nachgewiesen werden konnten, hatten einzelne Punktmutationen in den Teilabschnitten b und c. Variante 4 wies an Position 40 des ersten Teilabschnitts c eine Veränderung des Cytosins durch ein Thymin auf. Bei der anderen Variante wurde an Position 14 des Teilabschnitts b ein Guanin durch ein Cytosin ersetzt.

Die beiden letzten gefundenen Varianten zeigten eine Punktmutation an der ersten Position des Teilabschnitts b, wobei im Liquor das ehemals dort vorhandene Thymin durch ein Adenin, im Serum hingegen durch ein Cytosin ersetzt wurde.

Patient 8:



Abb. 36: Schematische Darstellung der Majorvariante sowie der gefundenen Minorvarianten im Liquor und Serum von Patient 8. Die Buchstaben sowie Nummern in Klammern beziehen sich auf das Gliederungs- und Nummerierungsschema des JCV-Archetyps. Sie geben an, welche Basen bzw. Nukleotide des JCV-Archetyps in dieser Sequenz enthalten sind und ob das entsprechende Teilstück in seiner ursprüngliche Länge vorhanden oder verkürzt ist;

= Patient, CSF = Cerebrospinal fluid (Liquor), S = Serum (Serum), Majorvariante = Consensussequenz; Minorvariante = Quasispezies; ORI = origin of replication (umfasst 12 bp),
 e fehlende Base, ★= Punktmutation.

Variante/	Mengenanteil in %	
Quasispezies		
CSF-Majorvariante	97,4	
CSF-Minorvariante $\mathbf 1$	1,75	
CSF-Minorvariante 2	0,85	
S-Majorvariante	79,36	
S-Minorvariante 1	11,73	
S-Minorvariante 2	2,73	
S-Minorvariante 3	6,17	

Tabelle 20: Anteile der Major- und Minorvarianten in der Liquor- und Serumprobe vonPatient 8. Die Werte sind in Prozent angegeben und wurden in der Analyse derTiefensequenzierung bestimmt.

CSF = *Cerebrospinal fluid* (Liquor), S = *Serum* (Serum), Majorvariante = Consensussequenz; Minorvariante = Quasispezies.

Die schon bei der Consensussequenz von Patient 8 vorkommenden, durchaus sehr komplexen *Rearrangements* zeigten sich auch in den in Liquor und Serum gefundenen Quasispezies (siehe hierzu Abb. 36 und für die prozentuale Verteilung Tabelle 20). 2 der 3 gefundenen Minorvarianten ließen sich in beiden Körperflüssigkeiten nachweisen, die erste war 23 bp länger als die korrespondierende Majorvariante, die andere um 61 bp kürzer. Die bereits in der Majorvariante vorhandenen Nukleotidveränderungen in Teilabschnitt f (fehlende Base sowie Punktmutation) waren in allen gefundenen Minorvarianten wiederzufinden.

Die erste Liquor-Serum-Quasispezies setzte sich folgendermaßen zusammen: a (vollständig: 1-25), b (vollständig: 1-23), c (erste 33 bp), d (letzte 9 bp), e (erste 11 bp), a (letzte 13 bp), b (letzte 18 bp), c (erste 33 bp), d (letzte 9 bp), e (vollständig: 1-18), f (fehlende Basen A und G an Position 19 und 20,

zusätzlich Punktmutation an Position 24 (A-->G), sonst vollständig: 1-69). Hier wurde das duplizierte Teilstück a, welches in der Majorvariante lediglich 8 Basenpaare lang war, um 5 bp erweitert und ein 18 bp langes Teilstück b insertiert.

Bei der zweiten Quasispezies, die ebenfalls in Liquor und Serum gefunden wurde, zeigten sich größere Deletionen von den in der Majorvariante duplizierten Teilabschnitten (e, a, c, d), sodass diese in der Variante nur einmal vorkamen. Die Abfolge der Teilstücke lautete: a (vollständig: 1-25), b (vollständig: 1-23), c (erste 33 bp), d (letzte 9 bp), e (vollständig: 1-18), f (fehlende Basen A und G an Position 19 und 20, zusätzlich Punktmutation an Position 24 (A->G), sonst vollständig: 1-69).

Es wurde im Serum des Patienten 8 noch eine weitere Minorvariante gefunden, die sehr große Ähnlichkeit zu Quasispezies Nr. 1 hatte. Sie waren fast identisch, bis auf die Tatsache, dass bei Minorvariante 3 der duplizierte Teilabschnitt b vollständig, also 23 bp lang war (während er bei Variante 1 nur die letzten 18 bp umfasste und somit 5 bp kürzer war). Somit war die Gesamtlänge dieser Variante um 28 bp größer als die zugehörige Consensussequenz und die Abfolge der Teilabschnitte lautete: a (vollständig: 1-25), b (vollständig: 1-23), c (erste 33 bp), d (letzte 9 bp), e (erste 11 bp), a (letzte 13 bp), b (vollständig: 1-23), c (erste 33 bp), d (letzte 9 bp), e (vollständig: 1-18), f (fehlende Basen A und G an Position 19 und 20, zusätzlich Punktmutation an Position 24 (A->G), sonst vollständig: 1-69).

Patient 9:



Abb. 37: Schematische Darstellung der Majorvariante sowie der gefundenen Minorvarianten im Liquor und Serum von Patient 9. Die Buchstaben sowie Nummern in Klammern beziehen sich auf das Gliederungs- und Nummerierungsschema des JCV-Archetyps. Sie geben an, welche Basen bzw. Nukleotide des JCV-Archetyps in dieser Sequenz enthalten sind und ob das entsprechende Teilstück in seiner ursprüngliche Länge vorhanden oder verkürzt ist;

= Patient, CSF = Cerebrospinal fluid (Liquor), S = Serum (Serum), Majorvariante =
Consensussequenz; Minorvariante = Quasispezies; ORI = origin of replication (umfasst 12 bp),
V = zusätzliche Base, • = fehlende Base.

Variante/	Mengenanteil in %
Quasispezies	
CSF-Majorvariante	98,19
CSF-Minorvariante ${f 1}$	1,05
CSF-Minorvariante 2	0,76
S-Majorvariante	98,76
S-Minorvariante ${f 1}$	1,24

Tabelle 21: Anteile der Major- und Minorvarianten in der Liquor- und Serumprobe vonPatient 9. Die Werte sind in Prozent angegeben und wurden in der Analyse derTiefensequenzierung bestimmt.

CSF = Cerebrospinal fluid (Liquor), S = Serum (Serum), Majorvariante = Consensussequenz; Minorvariante = Quasispezies.

Bei Patient 9 fand sich eine übereinstimmende Minorvariante sowohl im Liquor als auch im Serum (Abb. 37), die Deletionen gegenüber der Consensussequenz zeigte – insbesondere in Bezug auf die Teilstücke von d und c. Hier wurden folgende Teilstücke entfernt: d (Teilstück: 6-23; insgesamt 18 bp), c (Teilstück: 15-26, insgesamt 12 bp), d (letzte 14 bp). Letzendlich lautete die um 45 bp kürzere Sequenz wie folgt: a (vollständig: 1-25), b (erste 14 bp), c (letzte 23 bp), d (erste 23 bp), c (Teilstück: 15-26, insgesamt 12 bp), d (letzte 14 bp), e (fehlende Base A an Position 10, sonst vollständig: 1-18), f (vollständig: 1-69). Darüber hinaus wurde lediglich im Liquor eine weitere Quasispezies gefunden, die allerdings nur eine einzelne fehlende Base A im Teilabschnitt a an der 18. Position aufwies.

Die in der Tiefensequenzierung bestimmte prozentuale Häufigkeit der Major- und Minorvarianten von Patient 9 ist in Tabelle 21 abgebildet.



Patient 10:

Abb. 38: Schematische Darstellung der Majorvariante sowie der gefundenen Minorvarianten im Liquor und Serum von Patient 10. Die Buchstaben sowie Nummern in Klammern beziehen sich auf das Gliederungs- und Nummerierungsschema des JCV-Archetyps. Sie geben an, welche Basen bzw. Nukleotide des JCV-Archetyps in dieser Sequenz enthalten sind und ob das entsprechende Teilstück in seiner ursprüngliche Länge vorhanden oder verkürzt ist;

= Patient, CSF = Cerebrospinal fluid (Liquor), S = Serum (Serum), Majorvariante = Consensussequenz; Minorvariante = Quasispezies; ORI = origin of replication (umfasst 12 bp),
 e fehlende Base, ▼ = zusätzliche Base.

Variante/	Mengenanteil in %
Quasispezies	
CSF-Majorvariante	96,87
CSF-Minorvariante ${f 1}$	0,84
CSF-Minorvariante 2	1,66
CSF-Minorvariante 3	0,63
S-Majorvariante	95,36
S-Minorvariante ${f 1}$	4,64

Tabelle 22: Anteile der Major- und Minorvarianten in der Liquor- und Serumprobe vonPatient 10. Die Werte sind in Prozent angegeben und wurden in der Analyse derTiefensequenzierung bestimmt.

CSF = Cerebrospinal fluid (Liquor), S = Serum (Serum), Majorvariante = Consensussequenz; Minorvariante = Quasispezies.

Bei Patient 10 ließ sich eine einige Deletionen aufweisende Sequenz in Liquor und Serum nachweisen. Zudem wurden nur im Liquor zwei weitere Sequenzen gefunden, die eine fehlende bzw. zusätzliche Base im Teilabschnitt a aufwiesen, sonst aber identisch zur Majorvariante waren (gezeigt in Abb. 38, prozentuale Verteilung dargestellt in Tabelle 22).

Die erste Minorvariante war durch die Deletionen der (teil)- duplizierten Teilabschnitte e (1-11), b (5-23), c (1-29; 34-46) und d (62-66) um insgesamt 77 Basenpaare kürzer als die Majorvariante. Die Abfolge der bestehenden Teilabschnitte lautete nun: a (vollständig: 1-25), b (erste 16 bp), c (Teilstück: 13-29; insgesamt 17 bp), c (Teilstück: 34-46; insgesamt 13 bp), d (letzte 5 bp), e (vollständig: 1-18), f (vollständig: 1-69).

Bei den weiteren, nur im Liquor gefundenen Sequenzen mit Nukleotidveränderungen fehlte bei der einen Variante ein Adenin an Position 18, bei der anderen Variante war ein weiteres Adenin zwischen der 18. und 19. Position insertiert worden.

Im Folgenden wurden auch potenzielle Quasispezies bzw. Minorvarianten bei den Einzelsequenzen (ohne korrespondierende Liquor- bzw. Serumprobe) analysiert und zu der zugehörigen Consensussequenz nach dem Archetypnummerierungsschema ausgerichtet. Bei der Liquorprobe von Patient 12 sowie bei der Serumprobe von Patient 16 (der gefundene Archetyp) konnten keine weiteren Quasispezies detektiert werden.

Patient 11:



Abb. 39: Schematische Darstellung der Majorvariante sowie der gefundenen Minorvarianten im Liquor von Patient 11. Die Buchstaben sowie Nummern in Klammern beziehen sich auf das Gliederungs- und Nummerierungsschema des JCV-Archetyps. Sie geben an, welche Basen bzw. Nukleotide des JCV-Archetyps in dieser Sequenz enthalten sind und ob das entsprechende Teilstück in seiner ursprüngliche Länge vorhanden oder verkürzt ist; # = Patient, CSF = Cerebrospinal fluid (Liquor), Majorvariante = Consensussequenz; Minorvariante = Quasispezies; ORI = origin of replication (umfasst 12 bp), \star = Punktmutation, • = fehlende Base, \vee = zusätzliche Base.

Variante/	Mengenanteil in %
Quasispezies	
CSF-Majorvariante	93,16
CSF-Minorvariante ${f 1}$	2,95
CSF-Minorvariante 2	1,97
CSF-Minorvariante 3	0,72
CSF-Minorvariante 4	0,62
CSF-Minorvariante 5	0,58

Tabelle 23: Anteile der Major- und Minorvarianten in der Liquorprobe von Patient 11. Die Werte sind in Prozent angegeben und wurden in der Analyse der Tiefensequenzierung bestimmt.

CSF = Cerebrospinal fluid (Liquor), Majorvariante = Consensussequenz; Minorvariante = Quasispezies.

Im Liquor von Patient 11 ließen sich überdurchschnittlich viele Minorvarianten feststellen (siehe Abb. 39), insgesamt 5. Drei von diesen zeigten *Rearrangements*, Deletionen bzw. Insertionen der auch in der Majorvariante vorkommenden Teilstücke wie c (1-27) oder d (59-66), eine der 5 Varianten bildete bis auf einzelne Nukleotidabweichungen fast den Archetyp ab – in den anderen Patientenproben war sonst nicht der Archetyp als Quasispezies zu finden. Somit war das Archetyp-Vorkommen hierbei eine

wirkliche Besonderheit. Die letzte der Minorvarianten enthielt nur eine zusätzliche Base im Teilabschnitt a.

Die erste Minorvariante unterschied sich in den Teilabschnitten b und f zum regulären bzw. ursprünglichen Archetyp. Bei Teilabschnitt b fand sich eine Punktmutation an Position 20, bei der ein Adenin durch ein Guanin ersetzt wurde. Zudem fehlten in Teilabschnitt f ein Adenin und ein Guanin an den Positionen 19 und 20, an der 24. Position wurde ein Adenin durch ein Guanin getauscht. Ansonsten bestanden keine Unterschiede zum Archetyp.

Bei Minorvariante 2 war die Grundstruktur der Consensussequenz erhalten geblieben – es wurden noch zwei weitere Basen (A+G, deren Ursprung nicht genau definierbar war), ein weiteres Teilstück c (8-27) sowie d (59-66) vor den letzten beiden Teilabschnitten e (1-18) sowie f (1-7; 27-69) hinzugefügt, sodass diese Variante 30 Basenpaare länger war als die Majorvariante. Zusätzlich war der Teilabschnitt f etwas anders aufgebaut als bei der zugehörigen Consensussequenz – bei dieser Variante waren die ersten 7 Basenpaare (und nicht wie bei der Majorvariante die ersten 8) und die letzten 43 Basenpaare enthalten, wobei ein Thymin an der 29. Position fehlte. Bei der Majorvariante hingegen waren die letzten 42 bp vorhanden, wobei hier ebenfalls das Thymin an Position 29 fehlte. Die genaue Abfolge der Teilstücke bzw. Teilabschnitte lautete deswegen: a (erste 21 bp), b (Punktmutation an Position 20 (A->G); sonst vollständig: 1-23), c (erste 27 bp), d (letzte 8 bp), vermutlich e (erste 3 bp), c (Teilstück: 16-27; insgesamt 12 bp), d (letzte 8 bp), e (erste 9 bp), b (Punktmutation an Position 20 (A->G); Teilstück: 20-23, insgesamt 4 bp), c (erste 27 bp), d (letzte 8 bp), zusätzliche Basen (A+G, Ursprung nicht genau definierbar), c (Teilstück: 8-27, insgesamt 20 bp), d (letzte 8 bp), e (vollständig: 1-18), f (erste 7 bp), f (fehlende Base T an Position 29; Teilstück: 27-69, insgesamt 42 bp).

Minorvariante 3 war zu der Majorvariante bis auf den Teilabschnitt f absolut identisch. Während bei der Majorvariante das Teilstück f (9-27) fehlte, war dieses in der Variante eingefügt. Allerdings fehlten hier die Basen Adenin und Guanin (Position 19+20) und ein Adenin war durch ein Guanin an Position 24 ersetzt worden. Diese Nukleotidveränderungen in Teilabschnitt f zeigten sich auch schon bei der ersten, dem Archetyp sehr ähnlichen Variante. Durch die Unterschiede bzw. das Einfügen des fehlenden Teilstücks f in dieser Variante war diese Sequenz um 18 bp länger als die Consensussequenz.

Die sich durch mehrere Deletionen auszeichnende Minorvariante 4 war um 23 bp verkürzt gegenüber der Majorvariante. Das ursprünglich vollständige Teilstück b wurde hier auf die ersten 5 Basenpaare eingekürzt. Darüber hinaus wurden folgende Teilstücke entfernt: d (59-66), e (1-3) und c (16-27; insgesamt 12 bp). Die dadurch entstandene Sequenz lautete deswegen: a (erste 21 bp), b (erste 5 bp), c (erste 27 bp), d (letzte 8 bp), e (erste 9 bp), b (Punktmutation an Position 20 (A->G); Teilstück: 20-23, insgesamt 4 bp), c (erste 27 bp), d (letzte 8 bp), e (vollständig: 1-18), f (fehlende Basen A+G an Position 19+20; Punktmutation an Position 24 (A->G), sonst vollständig: 1-69).

Bei der letzten im Liquor von Patient 11 gefundenen Variante wurde lediglich ein weiteres Adenin zwischen die Positionen 18 und 19 im Teilabschnitt a eingefügt.

Die prozentuale Häufigkeit der Majorvariante und den jeweiligen Minorvarianten in der Liquorprobe von Patient 11 ist in Tabelle 23 gezeigt.

Patient 13:



Abb. 40: Schematische Darstellung der Majorvariante sowie der gefundenen Minorvariante im Liquor von Patient 13. Die Buchstaben sowie Nummern in Klammern beziehen sich auf das Gliederungs- und Nummerierungsschema des JCV-Archetyps. Sie geben an, welche Basen bzw. Nukleotide des JCV-Archetyps in dieser Sequenz enthalten sind und ob das entsprechende Teilstück in seiner ursprüngliche Länge vorhanden oder verkürzt ist;

= Patient, CSF = Cerebrospinal fluid (Liquor), Majorvariante = Consensussequenz; Minorvariante = Quasispezies; ORI = origin of replication (umfasst 12 bp), \star = Punktmutation.

Variante/	Mengenanteil in %
Quasispezies	
CSF-Majorvariante	91,16
CSF-Minorvariante ${f 1}$	8,84

Tabelle 24: Anteile der Major- und Minorvarianten in der Liquorprobe von Patient 13. Die Werte sind in Prozent angegeben und wurden in der Analyse der Tiefensequenzierung bestimmt.

CSF = *Cerebrospinal fluid* (Liquor), Majorvariante = Consensussequenz; Minorvariante = Quasispezies.

Die in Abb. 40 dargestellte Minorvariante wurde im Liquor des 13. Patienten gefunden und wies mehrere Deletionen gegenüber der dominierenden Majorvariante auf – die prozentuale Verteilung der Major- und Minorvariante, die in der Tiefensequenzierung bestimmt wurde, ist in Tabelle 24 abgebildet. Deletiert wurden folgende Teilabschnitte: e (4-18), c (34-39), e (4-18), b (Punktmutation an Position 1 (T-->G), sonst vollständig: 1-23) und c (1-39). Die aus den Deletionen resultierende Minorvariante setzte sich wie folgt zusammen: a (vollständig: 1-25), b (vollständig: 1-23), c (erste 39 bp), e (erste 3 bp fehlen, sonst vollständig: 4-18), f (vollständig: 1-69).

Auch hier wurden die in der Majorvariante vorkommenden Teilstücke wie das 39 bp-lange Teilstück c sowie das Teilstück e, bei dem die ersten 3 Basenpaare fehlten, in der bestehenden Form in die Minorvariante übernommen. Die Sequenz war um 98 Basenpaare verkürzt im Vergleich zur Consensussequenz.

Patient 14:



Abb. 41: Schematische Darstellung der Majorvariante sowie der gefundenen Minorvariante im Serum von Patient 14. Die Buchstaben sowie Nummern in Klammern beziehen sich auf das Gliederungs- und Nummerierungsschema des JCV-Archetyps. Sie geben an, welche Basen bzw. Nukleotide des JCV-Archetyps in dieser Sequenz enthalten sind und ob das entsprechende Teilstück in seiner ursprüngliche Länge vorhanden oder verkürzt ist; # = Patient, S = Serum (Serum), Majorvariante = Consensussequenz; Minorvariante =

= Patient, S = Serum (Serum), Majorvariante = Consensussequenz; Minorvariante = Quasispezies; ORI = origin of replication (umfasst 12 bp), ▼ = zusätzliche Base, ★= Punktmutation.

Variante/ Quasispezies	Mengenanteil in %
S-Majorvariante	98,3
S-Minorvariante 1	1,7

Tabelle 25: Anteile der Major- und Minorvarianten in der Serumprobe von Patient 14. Die Werte sind in Prozent angegeben und wurden in der Analyse der Tiefensequenzierung bestimmt.

S = Serum (Serum), Majorvariante = Consensussequenz; Minorvariante = Quasispezies.

Die im Serum von Patient 14 nachgewiesene Quasispezies zeigte im Vergleich zur Consensussequenz eine Punktmutation im ersten (dem vollständigen) Teilabschnitt c. Hier wurde an Position 39 ein Cytosin durch ein Thymin ersetzt. Ansonsten war die gefundene Variante übereinstimmend zur Majorvariante (siehe Abb. 41 und hinsichtlich der prozentualen Häufigkeit Tabelle 25). Patient 15:



Abb. 42: Schematische Darstellung der Majorvariante sowie der gefundenen Minorvarianten im Serum von Patient 15. Die Buchstaben sowie Nummern in Klammern beziehen sich auf das Gliederungs- und Nummerierungsschema des JCV-Archetyps. Sie geben an, welche Basen bzw. Nukleotide des JCV-Archetyps in dieser Sequenz enthalten sind und ob das entsprechende Teilstück in seiner ursprüngliche Länge vorhanden oder verkürzt ist;

= Patient, S = Serum (Serum), Majorvariante = Consensussequenz; Minorvariante = Quasispezies; ORI = origin of replication (umfasst 12 bp), ★= Punktmutation, • = fehlende Base, V = zusätzliche Base.

Variante/	Mengenanteil in %	
Quasispezies		
S-Majorvariante	98,77	
S-Minorvariante ${f 1}$	0,65	
S-Minorvariante 2	0,58	

Tabelle 26: Anteile der Major- und Minorvarianten in der Serumprobe von Patient 15. Die Werte sind in Prozent angegeben und wurden in der Analyse der Tiefensequenzierung bestimmt.

S = Serum (Serum), Majorvariante = Consensussequenz; Minorvariante = Quasispezies.

Im Serum des 15. Patienten wurden lediglich zwei Quasispezies gefunden (dargestellt in Abb. 42, prozentuale Verteilung gezeigt in Tabelle 26), die Nukleotidveränderungen im Teilabschnitt a aufwiesen, sonst aber identisch zur Majorvariante waren. Bei der einen Sequenz fehlte ein Adenin an Position 18 des Teilabschnitts a, bei der anderen Sequenz wurde ein weiteres Adenin zwischen der 18. und 19. Position hinzugefügt.

3.2.4 Gegenüberstellung der im Liquor bzw. im Serum gefundenen Minor-Varianten

Bezogen auf die insgesamt 26 Liquor- oder Serumproben wurden insgesamt 55 Quasispezies mittels *NGS* detektiert (allerdings sind einige davon identisch, da sie sowohl im Liquor als auch im Serum des gleichen Patienten auftraten – wenn man die identischen Sequenzen als eine Variante zählt, kommt man auf insgesamt 44 unterschiedliche Minorvarianten). 26 der 44 Sequenzen wiesen größere *Rearrangements* auf, 18 hingegen nur Punktmutationen bzw. Insertionen/Deletionen von einzelnen Basenpaaren im Vergleich zur dazugehörigen Consensussequenz. Von den insgesamt 26 Sequenzen mit größeren Teilabschnittveränderungen waren 19 kürzer als die korrespondierende Consensussequenz, lediglich 7 waren durch Insertionen von Teilstücken länger.

Durchschnittlich wurden 2,11 Minorvarianten in einer Patientenprobe (bezogen auf 26 Proben) gefunden, in den Liquorproben 2,46 (bezogen auf 13 CSF-Proben), in den Serumproben 1,76 (bezogen auf 13 Serumproben). Somit traten tendenziell mehr Quasispezies im Liquor als im Serum auf. Im Durchschnitt waren 1,61 der im Liquor gefundenen Sequenzen Varianten mit größeren *Rearrangements*, in den Serumproben waren es 0,92. Die Tendenz zeigte also auf, dass im Liquor nicht nur häufiger NCCR-Varianten detektiert wurden als im Serum, sondern dass diese auch stärker veränderte Variationen waren. Trotz der Vielfalt der Varianten sind sich wiederholende Muster in den Veränderungen erkennbar:

- Die gefundenen Minorvarianten mit größeren *Rearrangements* zeigen trotz der Veränderungen eine gut erkennbare Ähnlichkeit zur proportional häufiger vorliegenden Majorvariante
- Ein in der Consensussequenz verkürzter Abschnitt wie d (58-66) tritt meist in genau gleicher Form in der Quasispezies auf, dann allerdings dupliziert

- Die Anordnung der Teilabschnitte gleicht ebenfalls meist der Consensussequenz, ein Teil dieser Anordnung (z.B. e (4-18), b (1-23), c (1-39) lag entweder dupliziert oder komplett deletiert in den Minorvarianten vor
- Punktmutationen, die in der Consensussequenz in einem bestimmten Teilabschnitt vorkamen, traten meist in genau gleicher Weise im gleichen Teilabschnitt in der Minorvariante auf
- Nur die in der Majorvariante vorkommenden Teilabschnitte werden *resembled* werden (d.h., dass Teilabschnitte, die schon in der Consensussequenz nicht zu finden sind, auch nicht in den entsprechenden Minorvarianten auftreten – beispielsweise bei einer Majorvariante, die eine komplette Deletion des Teilabschnitts d zeigt, ist in keiner korrespondieren Minorvariante der Teilabschnitt d zu finden)
- Die Teilstücke aus der Majorvariante treten, wenn sie beispielsweise verkürzt in der Majorvariante auftreten, in den Minorvarianten dann auch verlängert (in Bezug auf das Archetypschema) auf (siehe z.B. #8 bei Teilabschnitt a oder #11 bei Teilabschnitt f); gleiches gilt auch für ursprünglich in der Majorvariante komplett vorkommende Teilabschnitte, die in der Minorvariante dann Deletionen aufweisen (siehe z.B. #6 bei Teilabschnitt e und f)
- An den "Grundbausteinen" der Sequenz ändert sich also nichts maßgeblich lediglich die Länge und die Anzahl dieser variieren in Bezug zur korrespondierenden Consensussequenz

Die Ähnlichkeit der Minorvarianten mit *Rearrangements* zu der Consensusequenz ist somit unübersehbar und wirft interessante Fragen zum Entstehungsprozess bzw. der "Abstammung" dieser Quasispezies auf.

In Bezug auf die Varianten, die sich hinsichtlich der Consensussequenz nur durch Punktmutationen oder einzelnen zusätzlichen bzw. fehlenden Basen unterscheiden, lässt sich festhalten, dass Punktmutationen in allen Teilabschnitten außer a auftreten, während besonders häufig eine Base, nämlich Adenin, aus dem Teilabschnitt a insertiert bzw. deletiert wurde.

Besonders auffallend war die Tatsache, dass bei den 3 Liquor-Serum-Paaren mit ungleicher Consensussequenz unterschiedliche Minorvarianten detektiert wurden, die entweder nur im Liquor oder nur in der Serumprobe nachgewiesen werden konnten (abgesehen von #1, bei dem in der Serumprobe keine weiteren Minorvarianten gefunden werden konnten). Hinsichtlich dieses Umstands unterscheiden sie sich ganz klar zu den restlichen Liquor-Serum-Pärchen. Bei den 7 Liquor-Serum-Paaren mit übereinstimmender Majorvariante hingegen gab es nämlich sowohl Minorvarianten, die im Liquor sowie im Serum gefunden wurden, als auch welche, die nur in der Liquor- oder Serumprobe detektiert wurden. Durchschnittlich wurden 1,57 Sequenzen (11 Sequenzen auf 7 Liquor-Serum-Paare), die sowohl im Liquor als auch im Serum auftraten, dokumentiert. Hervorzuheben ist hierbei, dass bei allen 7 Liquor-Serum-Paaren mit übereinstimmender Consensussequenz grundsätzlich mindestens eine, z.T. auch mehrere Minorvarianten gefunden wurden, die in beiden untersuchten Körperflüssigkeiten nachgewiesen wurden. Grundsätzlich wurde bei diesen 7 Probenpaaren mind. 1 Sequenz gefunden, die gegenüber der jeweiligen Consensussequenz mehrere Basenpaare umfassende Deletionen aufwies und somit verkürzt war. Bei näherer Betrachtung dieser verkürzten Minorvarianten ist auffallend, dass meist mittelstehende Teilstücke (wie c, d und e) deletiert wurden, während die Teilstücke wie a (1-25), b (1-23) und f (1-69), die zu Beginn bzw. am Ende der NCCR stehen, meist unverändert blieben.

Bei 2 der 7 Pärchen wurde ebenfalls in beiden Körperflüssigkeiten neben der verkürzten Minorvariante auch eine im Vergleich zur Consensussequenz um mehrere Basenpaare bzw. mehrere Teilabschnitte verlängerte Sequenz gefunden – auch hier war die "Abstammung" von der Majorvariante mit ihrer charakteristischen Teilabschnittabfolge und deren Länge eindeutig erkennbar. Es lässt sich bei den 10 untersuchten Liquor-Serum-Patientenprobenpaare festhalten, dass sich ein sehr heterogenes Bild hinsichtlich der Minorvarianten zeigt – die Trends in beiden Gruppen sind allerdings recht eindeutig: in den 3 Paaren mit nicht übereinstimmender Consensussequenz lassen sich keine identischen Minorvarianten in Liquor und Serum finden, bei den anderen 7 Paaren mit übereinstimmender Consensussequenz hingegen schon. Eine besondere Ausnahme stellt das Liquor-Serum-Pärchen von #3 dar – hier konnte die im Serum vorhandene Majorvariante als Minorvariante im Liquor detektiert werden, umgekehrt war die Liquor-Majorvariante allerdings nicht im Serum als Minorvariante feststellbar.

Betrachtet man die 6 einzelnen Liquor- bzw. Serumproben (bei denen nur bei 4 Proben Minorvarianten gefunden werden konnten), ist auffallend, dass die in den Liquorproben vorhandenen Minorvarianten primär durch *Rearrangements* entstanden sind und somit stärker verändert in Bezug auf die zugehörige Consensussequenz sind als die Serumproben, bei denen man nur Varianten mit einzelnen Punktmutationen bzw. einzelnen zusätzlichen/fehlenden Basen detektieren konnte.

Auffallend ist die Liquorprobe von #11 mit 5 zugehörigen Minorvarianten (4 mit größeren *Rearrangements*, 1 mit einer zusätzlichen Base im ersten Teilabschnitt a), von der eine bis auf einzelne Basenabweichungen dem Archetyp entspricht. Die Grundstruktur der Consensussequenz von #11 CSF– bestehend aus vielen, kleinen Stücken der Teilabschnitte mit charakteristischer Länge – findet sich auch hier in den Minorvarianten sehr gut wieder, bis auf den Teilabschnitt f, der bei insgesamt 3 der 5 Minorvarianten nicht wie in der Consensussequenz auftritt (f (1-8) und f (28-69), sondern in der Art und Weise, in der er bei der Archetyp-ähnlichen Minorvariante des gleichen Patienten (f (1-69) detektiert wurde.

3.2.5 Zusammenfassung der Analyse der Tiefensequenzierung

Wie bei der vorangegangenen Untersuchung der NCCR-Consensussequenzen der 26 Patientenproben zeigt sich auch bei der Analyse der dazugehörigen Minorvarianten ein sehr heterogenes Bild. Die Anzahl der in einer Patientenprobe gefundenen Minorvarianten reicht von 0 bis 6 – die gefundenen Unterschiede zur Majorvariante sind teils sehr gering (in Form von einzelnen Basenveränderung bzw. – deletionen und -insertionen), teils werden auch größere *Rearrangements* bzw. Insertionen und Deletionen von mehreren Teilabschnitten gefunden. Hierbei ist hervorzuheben, dass der Grundaufbau bzw. die Abfolge der Teilstücke der Consensussequenz in der Regel in den Minorvarianten bestehen bleibt. Meist werden in der Sequenz mittelstehende Stücke deletiert oder dupliziert und an anderer Stelle wieder insertiert. Die Ähnlichkeit zur Majorvariante ist allerdings in der überwiegenden Zahl der Fälle bzw. Minorvarianten gut zu erkennen. Grundsätzlich lässt sich festhalten, dass im Liquor tendenziell häufiger und dann auch im Vergleich zur zugehörigen Consensussequenz stärker veränderte Sequenzen gefunden werden.

Die Beobachtungen bei den 10 Liquor-Serum-Probenpaaren ist durchaus auch sehr divers – bei den Paaren mit übereinstimmender Consensussequenz lässt sich in beiden Körperflüssigkeiten mindestens eine identische Minorvariante finden, die im Vergleich zur Majorvariante verkürzt ist. Zum Teil gibt es noch mehr identische Minorvarianten, zum Teil lassen sich auch Minorsequenzen feststellen, die entweder nur im Serum oder nur im Liquor zu finden sind. Bei den übrigen Paaren mit nicht-gleicher Consensussequenz sind die detektierten Minorvarianten im Liquor und Serum stets unterschiedlich. Die NGS-Untersuchung bei dem Material von #3 ist insofern einzigartig und sehr interessant, als dass die Majorvariante im Serum als Minorvariante im Liquor detektiert werden konnte.

Diese für das jeweilige Patienten- bzw. Gruppenkollektiv (ungleiche/gleiche Liquor-Serum-Consensussequenz) einheitliche Beobachtung lässt unterschiedliche Vermutungen zur Dissemination des JC-Virus, der Pathogenese der PML sowie der Entstehung der Major- und Minorvarianten zu, die in der Diskussion näher erläutert werden.

3.3 Durchflusszytometrische Auswertung

3.3.1 Hintergrund der Untersuchung

Die patientenindividuellen NCC-Regionen werden in ein bidirektionales Reporterplasmid kloniert, welches die Promotor-Eigenschaften der NCC-Region sowohl in 5'-> 3', als auch in 3'-> 5' Richtung abliest. Im intakten, natürlich vorkommenden Polyomavirus werden die sogenannten frühen Proteine (T-Antigene) und späten Proteine (Strukturproteine) durch gegenläufige RNA-Syntheserichtungen auf dem zirkulären Virusgenom unter der Kontrolle der NCCR zur Expression gebracht. Dies spiegelt sich im Design des Reporterplasmids wider, bei dem die bidirektionale Transkription durch unterschiedliche farbstoffkodierende Genregionen messbar gemacht wird. Die einzelnen Plasmide mit der jeweiligen Patienten-NCCR werden in Zellen transfiziert und die Expression der Reporter- bzw. farbstoffkodierenden Genregionen mittels FACS-Analyse gemessen. Die Transkription der frühen Proteine bzw. die frühe Promotoraktvität (early gene expression) wird durch die Expression des Fluorophors tdTomato, also durch rote Fluoreszenz, sichtbar gemacht bzw. gemessen. Die Transkription der späten Proteine bzw. die späte Promotoraktvität (late gene expression) wird durch die Expression des Fluorophors eGFP, also durch grüne Fluoreszenz, sichtbar gemacht bzw. gemessen. Dieser Versuch (also Transfektion und Durchflusszytometrie) wird insgesamt dreimal unabhängig voneinander durchgeführt, wobei jeder Ansatz (also jedes patientenindividuelle Reporterplasmid) im Dreifachansatz bearbeitet wird. Zusätzlich zu der Transfektion der 26 Patientenreporterplasmide wird jeweils ein Reporterplasmid mit der Archetypsequenz, mit der Sequenz des MAD1-Stamms und mit der Sequenz des MAD4-Stamms in die HEK293T-Zellen transfiziert.

Mit diesem Versuchsaufbau soll geklärt werden, ob die mittels Sangersequenzierung festgestellten *Rearrangements* der Patienten-NCCR Einfluss auf die Promotoraktivität und somit auch auf die Replikationsfähigkeit des JC-Virus haben. Es soll nicht nur getestet werden, ob sich ein Unterschied hinsichtlich der frühen und späten Genexpression im Vergleich zum Archetyp beobachten lässt, sondern auch, wie stark dieser Unterschied ist und ob ein Unterschied nur in Bezug auf die frühe oder späte Promotoraktvität oder auf beide Parameter feststellbar ist. Man möchte also herausfinden, ob die molekular detektierbaren Unterschiede auch funktionelle Auswirkungen haben. Die molekular und funktionell gefundenen Unterschiede sollen in einem weiteren Schritt in Korrelation zur entsprechenden JC-Viruslast in der Cerebrospinalflüssigkeit bzw. im Serum gesetzt werden.

3.3.2 Frühe und späte Promotoraktivität pro Patientenprobe

Zur Bestimmung des Fluoreszenzlevels betrachtet man die rot bzw. grün leuchtenden Zellen und bestimmt deren prozentualen Anteil auf alle einzelnen lebenden Zellen (*Viability Dye* 780 negativ). Um eine optimale Vergleichbarkeit sowohl zum Archetyp als auch unter den Proben zu erzeugen, wird das Fluoreszenzlevel auf die Werte des Archetyps normalisiert. Die gemessene frühe und späte Promotoraktivität des Archetyps wird auf 1, also 100%, gesetzt. Die Promotoraktivitäten der Patientenproben werden anhand dieses Normalisierungsschemas auf den Archetyp berechnet, sodass man schnell sehen kann, ob eine Steigerung oder Verringerung der Genexpression im Vergleich zum Archetyp durch die *Rearrangements* erzeugt wird und ob die beobachteten Veränderungen bei beiden Promotoraktivitäten im gleichen Maße eintreten oder nicht.

Im weiteren Verlauf dieses Kapitels wird nur mit den normalisierten Werten gearbeitet. An dieser Stelle soll kurz auf das Fluoreszenzverhalten des Archetyps eingegangen werden: dieser zeigt sowohl rote als auch grüne Fluoreszenz, wobei hervorzuheben ist, dass es ca. dreimal mehr grün fluoreszierende Zellen gibt als rote (d.h. dass die späte Promotoraktivität ca. dreimal so stark ist wie die frühe Promotoraktivität, wenn man lediglich die Anzahl der fluoreszierenden Zellen auf alle lebenden Zellen betrachtet). Man berechnet also von einem höheren "Startniveau" aus die späte Promotoraktivität, da diese im Archetyp stärker ist als die frühe.

Im Folgenden werden die Begriffe "Liquorproben" oder "Serumproben" bzw. deren Promotoraktivität verwendet. Hiermit ist die Promotoraktivität/ das Fluoreszenzverhalten gemeint, die durch das in HEK293T-Zellen transfizierte Reporterplasmid, welches mit der in der jeweiligen Liquorprobe/Serumprobe gefundenen NCC-Region ligiert wurde, hervorgerufen wird. Ähnliches soll auch berücksichtigt werden, wenn die Fluoreszenzintensität bzw. die Promotoraktivität einer einzelnen Patientenprobe besprochen wird.

In Abb. 43 und Abb. 44 sind die in Form der Fluoreszenzintensität gemessenen frühen und späten Promotoraktivitäten jeder Patientenprobe (aufgeteilt nach Liquor und Serum) dargestellt. Wie man dieser Abbildung sehr gut entnehmen kann, kommt es bei 24 der 26 Proben zu einer Steigerung der frühen Promotoraktivität, während die Genexpression der (späten) Strukturproteine nicht so stark ansteigt. Dabei variiert der Anstieg der Promotoraktivität jeder Patientenprobe im Vergleich zur Archetyppromotoraktivität stark. Die auf den Archetyp normalisierten Werte jeweils für frühe und späte Promotoraktivität jeder einzelnen Liquor- und Serumprobe sowie der p-Wert des t-Tests zum Aufzeigen des statistisch signifikanten Unterschieds zum Archetyp sind in Tabelle 27 zusammengefasst. Bei Betrachtung der Ergebnisse fällt auf, dass der p-Wert bei fast allen Proben kleiner 0.05 bzw. kleiner 0.01 ist. Daraus lässt sich schließen, dass man die angenommene Nullhypothese (Promotoraktivität des Archetyps und der jeweiligen Patientenprobe sind gleich) verwerfen kann und dass es einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Promotoraktivität des Archetyps und der Patientenprobe gibt. Es handelt sich hier aber um einen zweiseitigen t-Test – dieser zeigt also nicht nur an, wenn die Promotoraktivität signifikant gegenüber dem Archetyp ansteigt, sondern auch, wenn das Level signifikant unter dem des Archetyps liegt. Dies ist beispielsweise bei der späten Promotoraktivität in mehreren Proben (#1 CSF, #9 CSF, #9 S, #14 S und #15 S) der Fall.

NCCR-	Frühe Promotor-	<i>p</i> -Wert (frühe	Späte Promotor-	p-Wert (späte
Sequenz	aktivität	Promotor-	aktivität	Promotor-
	(normalisiert auf	aktivität)	(normalisiert auf	aktivität)
	Archetyp;		Archetyp;	
	Mittelwert)		Mittelwert)	
# 1 CSF	2,4216	0.006284	0,5892	0.002594
# 1 S	5,1112	0.000544	1,2923	0.007688
# 2 CSF	3,1632	0.001349	1,8175	0.001386
# 2 S	2,1247	0.004843	1,1861	0.016171
# 3 CSF	2,7821	9.816418e-05	1,5827	0.001267
# 3 S	2,0695	0.006751	1,1916	0.022778
# 4 CSF	4,7762	1.950544e-05	2,3325	0.000962
# 4 S	3,2203	0.001727	1,8083	0.003177

# 5 CSF	2,9133	0.001295	1,6616	4.008428e-05
# 5 S	2,5113	8.624556e-05	1,4455	0.003173
# 6 CSF	3,8884	6.775061e-05	1,8968	0.000583
# 6 S	5,6306	0.000622	3,2133	0.000576
# 7 CSF	3,0289	0.004643	1,4244	0.006977
# 7 S	4,5887	2.560134e-05	1,9203	0.000640
# 8 CSF	2,3836	0.000486	2,0352	0.001050
# 8 S	3,2322	0.002382	2,8862	0.000404
# 9 CSF	1,8886	0.000574	0,5082	2.240626e-05
# 9 S	2,011	0.002316	0,5299	0.000715
# 10 CSF	5,5801	0.000215	2,4564	0.001133
# 10 S	5,6952	4.634930e-05	2,2697	0.000803
# 11 CSF	2,0967	0.007283	2,0698	0.001377
# 12 CSF	1,3256	0.013288	1,1707	0.003694
# 13 CSF	3,6526	0.000193	2,4175	0.000766
# 14 S	1,0204	0.480475	0,4655	0.000349
# 15 S	1,7541	0.011032	0,5218	0.000823
# 16 S	1,0202	0.641171	0,9973	0.899193

Tabelle 27: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung hinsichtlich der frühen und späten Promotoraktivität jeder Probe normalisiert auf den Archetyp. Die Daten der frühen und späten Promotoraktivität stellen den berechneten Mittelwert aus allen Messergebnissen dar. Zudem ist der p-Wert des t-Werts (Signifikanzniveau 5%) mit abgebildet, der die Wahrscheinlichkeit abbildet, dass die Promotoraktivitätslevel des Archetyps und der jeweiligen Probe gleich sind.

Einen statistisch nicht signifikanten Unterschied konnte man bzgl. der frühen Promotoraktivität in der Serumprobe von Patient 14 sowie in der Serumprobe von Patient 16 hinsichtlich der frühen und späten Promotoraktivität feststellen. Die Sequenz von #16 S repräsentiert allerdings auch die Archetyp-Sequenz und ist somit – wie zu erwarten – auch auf Promotoraktivitätslevel des Archetyps.



Abb. 43: Darstellung der Fluoreszenzintensität des Archetyps, des MAD1, des MAD4 sowie der 26 Patientenproben normalisiert auf die Fluoreszenzintensität des Archetyps. Die 26 Patientenproben sind nach Patientennummern und nach Probentyp (Liquor oder Serum) geordnet. In Rot wird die rote Fluoreszenz (frühe Promotoraktivität) und in Grün die grüne Fluoreszenz (späte Promotoraktivität) abgebildet; # = Patient, CSF = Cerebrospinal fluid (Liquor), S = Serum (Serum)



Abb. 44: Alternative Darstellung der Fluoreszenzintensität des Archetyps, des MAD1, des MAD4 sowie der 26 Patientenproben normalisiert auf die Fluoreszenzintensität des Archetyps. Die 26 Patientenproben sind nach Patientennummern und nach Probentyp (Liquor oder Serum) geordnet. In Rot wird die rote Fluoreszenz (also die frühe Promotoraktivität) und in Grün die grüne Fluoreszenz (also die späte Promotoraktivität) abgebildet; # = Patient, CSF = Cerebrospinal fluid (Liquor), S = Serum (Serum)

Der t-Test zeigt, dass sowohl der Mittelwert der frühen Genexpression normalisiert auf den Archetyp als auch der Mittelwert der späten Genexpression normalisiert auf den Archetyp nicht gleich 1 ist. Das bedeutet, dass es einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Promotoraktivität aller Proben und dem Archetyp gibt. Der Mittelwert der frühen Promotoraktivität aller Proben liegt bei 3,072793 (p = 3.106313e-21) und zeigt mit einem sehr geringen p-Wert einen hochsignifikanten Unterschied zum Archetyp. Der Mittelwert der späten Promotoraktivität aller Proben liegt bei 1,603559 (p = 4.129e-10) und zeigt ebenfalls mit einem sehr geringen p-Wert einen hochsignifikanten Unterschied zur späten Promotoraktivität des Archetyps.

3.3.3 Frühe und späte Promotoraktivität im Liquor-Serum-Vergleich

Nachdem die Veränderung der Promotoraktivität bezogen auf eine einzelne Probe sowie auf die Gesamtheit aller Proben betrachtet wurde, soll nun der Fokus auf die Trennung der Liquor- bzw. Serumproben und deren Promotoraktivitätswerte gelegt werden. Hierbei soll untersucht werden, ob eine Gruppe bzw. ein Probentyp eine gesteigerte Promotoraktivität (früh oder spät) zeigt, die wiederum Rückschlüsse auf Virulenz und Replikationsfähigkeit der Virusspezies zulassen könnte. Frühe und späte Promotoraktivität aller Proben, jeweils unterteilt in CSF- und Serumproben, sind zusammengefasst in Abb. 45 dargestellt.

Wie man dieser entnehmen kann, kommt es bei den Liquorproben sowohl hinsichtlich der frühen als auch der späten Genexpression zu einer deutlichen Steigerung im Vergleich zum Archetyp. In Bezug auf beide Aktivitätswerte liegt der Median und auch der 25. (bzw. 75.) Interquartilsabstand über dem Archetypniveau (das in der Abbildung als orange gestrichelte Linie eingezeichnet ist). Die frühe Promotoraktivität hat stärker zugenommen als die späte Promotoraktivität. Bezogen auf die rote Fluoreszenz (frühe Genexpression) normalisiert auf den Archetyp zeigt sich ein Mittelwert von 3,07 und ein Median von 2,81. Der Mittelwert der grünen Fluoreszenz (= Expression der späten Strukturproteine) normalisiert auf den Archetyp liegt dagegen bei 1,69 und der Median bei 1,81. Anhand der Mittelwerte und der Ausreißer-stabileren Mediane kann man gut erkennen, dass es bei der späten Promotoraktivität der Liquorproben nicht zu so einem starken Anstieg wie bei der frühen Promotoraktivität gekommen ist.

Wirft man einen Blick auf das Genexpressionslevel der Serumproben, so zeigt sich hier ein ähnliches, aber kein identisches Bild. Die frühe Promotoraktivität bzw. deren Median und 25. und 75. Interquartilsabstand liegt – ähnlich wie bei den CSF-Proben – deutlich über dem Archetypniveau von 1. Hier kommt es also zu einer erkennbaren Steigerung der frühen Promotoraktivität. Hinsichtlich der Expression der späten Strukturproteine ist dieser Trend in der Abbildung nicht so eindeutig zu erkennen bzw. fällt deutlich schwächer aus. Betrachtet man die genauen Werte, also Mittelwert und Median, so zeigt sich in Hinblick auf die frühe Promotoraktivität aller Serumproben ein Mittelwert von 3,08 und ein Median, der bei 2,5 liegt. Die Werte der späten Genexpression der Serumproben stellen sich wie folgt dar: Mittelwert bei 1,52, Median bei 1,31. Wie die Liquorproben zeigen auch die Serumproben bei der frühen Promotoraktivität einen stärkeren Anstieg als bei der späten (was man insbesondere an den beschriebenen Mittelwerten und Medianen gut erkennen kann). Alle Werte werden stets auf den Archetyp und dessen Promotoraktivität normalisiert.



Abb. 45: Gegenüberstellung der frühen und späten Promotoraktivität (beide jeweils normalisiert auf den Archetyp) innerhalb der Liquor- bzw. Serumproben. Die frühe Promotoraktivität wird anhand der roten Fluoreszenzintensität normalisiert auf den Archetyp bestimmt, die späte Promotoraktivität anhand der grünen Fluoreszenzintensität normalisiert auf den Archetyp. Die orange-gestrichelte Linie zeigt die frühe und späte Promotoraktivität des Archetyps (Promotoraktivität=1), auf die normalisiert wird. Es wird jeweils die frühe Promotoraktivität der Liquorproben (bzw. der Serumproben) mit der späten Promotoraktivität dieser verglichen. Sowohl Liquor-, als auch Serumproben zeigen eine deutliche Steigerung der frühen Promotoraktivität gegenüber dem Archetyp. Zudem sind Werte der frühen Promotoraktivität höher als die der späten. Eingezeichnet sind der Median (schwarz gestrichelte Linie), der 25. Interquartilsabstand (untere schwarz gepunktete Linie) und der 75. Interquartilsabstand (obere schwarz gepunktete Linie); CSF = Cerebrospinal fluid (Liquor), S = Serum.

Um zu überprüfen, ob sich die Promotoraktivitäten - aufgeteilt nach früh und spät und jeweiligem Probentyp - statistisch signifikant von dem Expressionslevel bzw. der Promotoraktivität des Archetyps unterscheiden, führt man einen t-Test durch, um zu untersuchen, ob sich der Mittelwert der zu testenden Gruppe (z.B. frühe Promotoraktivität bei den Serumproben) signifikant von 1 (also dem Wert der frühen Promotoraktivität des Archetyps) unterscheidet.

Bezüglich der Liquorproben zeigt sich sowohl bei der frühen Promotoraktivität ((p < 0,001) = 1.197e-13) als auch bei der späten Promotoraktivität ((p < 0,001) = 2.686313e-08) ein hoch signifikanter Unterschied zum Aktivitätsniveau des Archetyps. Bei den Serumproben findet man ein ähnliches Bild – auch hier zeigt sich ein hoch signifikanter Unterschied zur Promotoraktivität des Archetyps bzgl. der frühen ((p < 0,001) = 1.29081e-09) und späten ((p < 0,001) = 0.0005196729) Genexpression.

Nachdem man zeigen konnte, dass es einen signifikanten Unterschied der beiden Promotoraktivitäten in Liquor und Serum zum Archetyp gibt, soll in einem nächsten Schritt mittels t-Test überprüft werden, ob sich die frühe bzw. späte Promotoraktivität zwischen Liquor- und Serumproben signifikant unterscheidet.

Die zu vergleichenden Größen bzw. Werte sind in Abb. 46 grafisch veranschaulicht. Wie man hier gut erkennen kann, steigt bei den Proben die frühe Promotoraktivität im Verhältnis zum Archetyp stärker

als die späte Promotoraktivität. Zusätzlich dazu sind keine Werte der frühen Promotoraktivität unter dem Archetyplevel, welches bei 1 liegt – dies ist allerdings bei der späten Promotoraktivität durchaus der Fall. Bzgl. der Genexpression der frühen Proteine kommt es also durchweg zu einer Steigerung bzw. einer Expression auf Archetypniveau, während bei der späten auch ein Rückgang im Vergleich zum Archetyp zu beobachten ist. Zusätzlich ist das Streuungsmaß bei den Serumproben, insbesondere in Bezug auf die frühe Genexpression, im Vergleich zu den Liquorproben höher.

Bei der Testung der frühen Promotoraktivität (Liquorproben vs. Serumproben) zeigt sich kein signifikanter Unterschied (p > 10%) – ebenso wie bei der Testung der späten Promotoraktivität, bei der man auch keinen signifikanten Unterschied (p > 10%) feststellen kann.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sowohl bei den CSF- als auch bei den Serumproben in Bezug auf die frühe und die späte Promotoraktivität im Vergleich zum Archetyp ein signifikanter Unterschied vorliegt, allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen den Probentypen in Bezug auf ein Genexpressionslevel detektiert werden kann.



Abb. 46: Vergleich der Promotoraktivität (unterteilt in früh und spät, beide jeweils normalisiert auf den Archetyp) zwischen den Liquor- und Serumproben. Die frühe Promotoraktivität wird anhand der roten Fluoreszenzintensität normalisiert auf den Archetyp bestimmt, die späte Promotoraktivität anhand der grünen Fluoreszenzintensität normalisiert auf den Archetyp. Die orange-gestrichelte Linie zeigt die frühe und späte Promotoraktivität des Archetyps (Promotoraktivität=1), auf die normalisiert wird. Es werden jeweils die Werte der Liquorproben und der Serumproben für die frühe respektive späte Promotoraktivität gegenübergestellt. Darüber hinaus sind der Median (schwarz gestrichelte Linie), der 25. Interquartilsabstand (untere schwarz gepunktete Linie) und der 75. Interquartilsabstand (obere schwarz gepunktete Linie) eingezeichnet; CSF = Cerebrospinal fluid (Liquor), S = Serum.

3.3.4 Korrelationsanalysen

Bei einer Korrelationsanalyse untersucht man, ob zwei oder mehrere Variablen miteinander korrelieren bzw. voneinander abhängig sind. In der vorliegenden Untersuchung soll überprüft werden,

ob ein solcher Zusammenhang zwischen den vorliegenden Parametern (frühe/späte Promotoraktivität, Viruslast in der jeweiligen Probe, Alter des Patienten, Geschlecht des Patienten, Probentyp) besteht. Dabei wird in der ersten Untersuchung die frühe und späte Promotoraktivität als Zielgröße festgelegt. Bei der zweiten Untersuchung betrachtet man die Viruslast. Man möchte analysieren, ob eine der o.g. Variablen einen Einfluss auf die beiden Zielgrößen hat. Insbesondere die Fragestellung, ob eine gesteigerte Promotoraktivität mit einer höheren Viruslast verbunden ist oder umgekehrt (dass eine hohe Viruslast mit einer gesteigerten Promotoraktivität assoziiert ist), ist hierbei zu klären. Darüber hinaus wird untersucht, ob bei einer bestimmten Patientengruppe (z.B. alte Männer, junge Frauen) die Promotoraktivität bzw. die Viruslast besonders hoch ist und hier ein signifikanter Einfluss dieser Variablen auf die Zielgröße vorliegt. Im ersten Schritt wird eine multivariate Korrelationsanalyse in Form einer linearen Regressionsanalyse mit mehreren beeinflussenden Variablen durchgeführt - also der Zusammenhang bzw. der Einfluss mehrerer Variablen auf die Zielgröße untersucht. Wenn sich hierbei ein signifikanter Einfluss einer Variablen zeigt, wird dieser in bivariaten Analysen in Form einer linearen Regressionsanalyse mit einer beeinflussenden Variablen und mit einem t-Test näher beleuchtet. Der t-Test wird zum Prüfen des signifikanten Unterschieds zuerst zweiseitig durchgeführt. Hierfür wird anhand der beeinflussenden Variablen die Kohorte in zwei Stichproben/Gruppen unterteilt (z.B. männlich vs. weiblich), eine sog. Klasseneinteilung. Um eine Aussage über den Trend dieses Einflusses zu geben, folgt ein einseitiger t-Test.

3.3.4.1 Zielgröße "Promotoraktivität"

Bei dieser Korrelationsanalyse soll überprüft werden, ob und welche Parameter einen signifikanten Einfluss auf die frühe bzw. späte Genexpression/Promotoraktivität haben. Als Einflussgrößen bzw. Variablen werden hierbei das Alter des Patienten, das Geschlecht des Patienten, die Höhe der Viruslast und der Probentyp (Liquor- oder Serumprobe) herangezogen. Bei der Zielgröße "Promotoraktivität" wird mit den auf den Archetyp normalisierten Werten gearbeitet.

Hinsichtlich der frühen Promotoraktivität/Genexpression der frühen Proteine, also der roten Fluoreszenz, lässt sich folgendes sagen: bei der multivariaten Analyse zeigt sich, dass das Geschlecht einen signifikanten Einfluss auf die Zielgröße hat. Dieser Zusammenhang kann auch in einer bivariaten Analyse (p=0.001464; Signifikanzniveau=1%) beobachtet werden. Der t-Test bestätigt diesen signifikanten Einfluss des Geschlechts auf die frühe Promotoraktivität und zeigt auf, dass es einen hochsignifikanten Unterschied zwischen der frühen Promotoraktivität männlicher und weiblicher Patienten gibt (p= 0.00003776; Signifikanzniveau= 0,01%) und der einseitige t-Test bestätigt, dass die Genexpression der frühen Proteine bei männlichen Patienten signifikant höher bzw. stärker ist als bei weiblichen Patienten (p= 0.00001888; Signifikanzniveau= 0,01%).

Weitere Parameter haben keinen signifikanten Einfluss auf die frühe Promotoraktivität.

Hinsichtlich der Genexpression der (späten) Strukturproteine als Zielgröße lässt sich folgendes festhalten: bei der multivariaten Analyse beobachtet man einen signifikanten Einfluss seitens des Alters des Patienten. Auch hier wird eine bestätigende bivariate Analyse durchgeführt, die den hochsignifikanten Einfluss des Patientenalters auf die späte Promotoraktivität bestätigt (p= 0.000278; Signifikanzniveau= 0,1%). Um den Einfluss des Patientenalters zu belegen, wird an dieser Stelle wieder ein t-Test durchgeführt. Hierfür vollzieht man eine Klasseneinteilung (d.h. man unterteilt die Patientenkohorte in zwei Gruppen) – dies ist am einfachsten anhand des arithmetischen Mittels des

Patientenalters, welches bei 62,375 Jahren liegt. Überprüft man nun, ob sich die späte Promotoraktivität bei jüngeren Patienten (< 62,375 Jahre) signifikant von älteren Patienten (\geq 62,375 Jahre) unterscheidet, zeigt sich ein schwach signifikantes Ergebnis (p= 0.09824; Signifikanzniveau= 10%). Der einseitige t-Test zeigt, dass das jüngere Patientenkollektiv eine stärkere/höhere späte Promotoraktivität vorweist als der ältere Teil der Patienten (p= 0.04912; Signifikanzniveau= 5%).

Betrachtet man die Altersverteilung erneut, so fällt auf, dass ein kleiner Patientenanteil (n=3) nicht älter als 40 Jahre ist und sich somit deutlich von den anderen Patienten, die meist älter als 60 oder 70 Jahre sind, abhebt. Führt man – nach Trennung der Patientenkohorte nach dem 40. Lebensjahr – erneut einen zweiseitigen t-Test durch, so zeigt sich ein stärker signifikantes Ergebnis (p=0.02599; Signifikanzniveau= 5%). Auch hier hat das jüngere Kollektiv durchschnittlich eine stärkere späte Promotoraktivität, wie der einseitige t-Test zeigt (p=0.013; Signifikanzniveau= 5%).

An dieser Stelle sei erwähnt, dass die vorab aufgeführten t-Teste aufgrund der sehr geringen Fallzahlen nur eine stark begrenzte Aussagekraft haben bzw. die Fallzahlen zu niedrig sind, um eine Aussage mit "echter" Signifikanz treffen zu können. Der Vollständigkeit halber sind sie dennoch aufgeführt.

3.3.4.2 Zielgröße "Viruslast"

Bevor man die Korrelationsanalyse mit der Zielgröße "Viruslast" durchführt, soll an dieser Stelle ein Blick auf die Höhe der Viruslasten an sich und deren Verteilung in den Liquor- bzw. Serumproben geworfen werden. Wie bereits erwähnt, liegen insgesamt 26 Viruslasten aus den 26 Proben vor, davon 13 aus dem Liquor und 13 aus dem Serum. Untersucht man die Viruslasten mittels t-Test, fällt auf, dass es einen signifikanten Unterschied zwischen der Viruslast im Liquor und der Viruslast im Serum gibt (p=0.005; Signifikanzniveau=1%). Der Mittelwert der Liquorviruslast liegt bei 222916,8 Kopien/ml, der Mittelwert der Serumviruslast bei 88769,15 Kopien/ml – die Viruslasten dieses untersuchten Patientenkollektivs sind also im Schnitt im Liquor höher als im Serum, wie man auch anhand des Boxplots in Abb. 47 erkennen kann (in der Abbildung sind die Ausreißer übersichtshalber nicht dargestellt). Der einseitige t-Test bestätigt ebenfalls, dass die Liquorviruslast signifikant höher als die Serumviruslast ist (p= 0.003; Signifikanzniveau=1%).



Abb. 47: Vergleich der JC-Viruslast (Kopienanzahl/ml) zwischen den Liquor- und Serumproben (je 13 Proben). Eingezeichnet sind Median (schwarzer mittlerer Balken innerhalb des Boxplots), 25. Interquartilsabstand (unterer Boxplotrahmen) sowie 75. Interquartilsabstand (oberer Boxplotrahmen). Die beiden Sternchen zeigen, dass es einen statistisch signifikanten Unterschied (p<0.01) zwischen den beiden Verteilungen gibt; CSF = Cerebrospinal fluid (Liquor), S = Serum.

Abschließend wird getestet, ob und welche Parameter einen signifikanten Einfluss auf die Viruslast haben. Als Einflussgrößen bzw. Variablen werden hierbei das Alter des Patienten, das Geschlecht des Patienten, die frühe Promotoraktivität, die späte Promotoraktivität und der Probentyp (Liquor- oder Serumprobe) herangezogen - bei der Variablen "Promotoraktivität" wird mit auf den Archetyp normalisierten Werten gearbeitet.

Bei der multivariaten Analyse zeigt sich, dass lediglich seitens des Probentyps ein signifikanter Einfluss auf die Viruslast existiert. Dieser signifikante Zusammenhang wurde bereits an vorheriger Stelle beschrieben. Ansonsten kann kein signifikanter Einfluss einer Variablen auf die Zielgröße "Viruslast" beobachtet werden.

In Abb. 48 ist eine kombinierte Darstellung des Einflusses der frühen und späten Promotoraktivität auf die JC-Viruslast zu finden. Hier ist einerseits der nicht signifikante Einfluss der frühen Promotoraktivität auf die Zielgröße Viruslast (u.a. erkennbar an dem Korrelationskoeffizient r=0,00 sowie dem p-Wert >10%) dargestellt. Andererseits ist auch der Einfluss der späten Promotoraktivität auf die Zielgröße Viruslast gezeigt. Hier sieht man anhand des Korrelationskoeffizienten von r=0,17 und einem p-Wert von 0,13, dass kein bzw. kein starker statistischer Zusammenhang zwischen den beiden Variablen existiert.



Abb. 48: Kombinierte Darstellung des Einflusses der frühen und späten Promotoraktivität (normalisiert auf den Archetyp) auf die JC-Viruslast (Kopienanzahl/ml). Die frühe Promotoraktivität wird anhand der roten Fluoreszenzintensität normalisiert auf den Archetyp bestimmt, die späte Promotoraktivität anhand der grünen Fluoreszenzintensität normalisiert auf den Archetyp. Die roten Punkte stehen für die frühe Promotoraktivität der insgesamt 26 Proben, die grünen Punkte für die späte Promotoraktivität. Man erkennt – u.a. anhand der beiden Ausgleichsgeraden - keinen statistisch signifikanten Zusammenhang.

3.3.5 Zusammenfassung der durchflusszytometrischen Analysen

Bei der durchflusszytometrischen Auswertung und Bewertung der Promotoraktivitäten der einzelnen Liquor- und Serumproben zeigt sich – ähnlich wie bei der Sanger- und Tiefensequenzierung – kein einheitliches Bild, allerdings ist hier bei den meisten Proben eine klare Tendenz zu erkennen. Sie zeigen eine signifikante Steigerung der Promotoraktivität im Vergleich zum Archetyp. Diese ist insbesondere hinsichtlich der frühen Promotoraktivität sowohl bei den Liquor- als auch bei den Serumproben zu erkennen – bei 14/16 Proben kam es zu einer statistisch relevanten Steigerung. Die Streuung der Werte bzw. zwischen den Proben ist hier recht groß. Hinsichtlich der späten Promotoraktivität ist das Bild insofern varaibler, als dass hier auch ein Abfall des Aktivitätslevels im Vergleich zum Archetyp beobachtet werden konnte. Zwar zeigte sich bei 20 der 26 untersuchten Probe eine Steigerung der späten Promotoraktivität, allerdings fiel diese deutlich schwächer als bei der frühen Promotoraktivität aus. Konzentriert man sich auf den Vergleich zwischen Liquor- und Serumproben, so ist hier kein signifikanter Unterschied detektierbar. Die Streuung der einzelnen Promotoraktivitätslevel ist allerdings bei den Serumproben – insbesondere hinsichtlich der frühen Promotoraktivität – größer. Bei den Korrelationsanalysen zeigt sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen weiblichen und männlichen Patienten hinsichtlich der frühen Promotoraktivität sowie zwischen einem jüngeren und älteren Patientenkollektiv hinsichtlich der späten Promotoraktivität. Weiterhin zeigt sich, dass die JC-Viruslast im Liquor signifikant höher im Vergleich zur gemessenen JCV-Last im Serum ist. Mögliche Interpretationen dieser Ergebnisse – insbesondere in Hinsicht auf die verschiedenen, zugrundeliegenden NCCR-Varianten – werden im kommenden Diskussionsteil näher beleuchtet.

4 Diskussion

Diese Arbeit stellt eine kombinierte molekulare und funktionale Analyse der nicht kodierenden Kontrollregion (NCCR) des JC-Virus dar. Da es sich bei der PML um eine seltene Erkrankung handelt, ist das Probenkollektiv trotz seiner Überschaubarkeit als das bisher größte in der Literatur beschriebenen Probenkollektiv zu werten. Hinsichtlich der Methodik wurden die Sangersequenzierung, die Tiefensequenzierung und die Durchflusszytometrie eingesetzt.

Untersucht wurden insgesamt 26 verschiedene Proben von Patienten mit manifester PML, 13 Liquorund 13 Serumproben. Zum einen besteht das Kollektiv aus 10 Probenpaaren, die jeweils von einem Patienten am gleichen Tag entnommen wurden, zum anderen aus 3 einzelnen Liquor- und 3 einzelnen Serumproben ohne zugehöriges Pendant. Aus diesen Proben wurde die virale Nukleinsäure extrahiert, die NCCR amplifiziert und im Anschluss sequenziert.

Das JC-Virus löst eine fatale, lebensbedrohliche neurologische Erkrankung, die progressive multifokale Leukenzephalopathie aus. Eine effektive, etablierte Therapie existiert zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht. Der ätiologische Verursacher (das JCV) sowie begünstigende Begleitumstände (Immunsuppression, Veränderungen in der NCCR) sind zwar bekannt [1, 28, 89], allerdings bleiben viele Fragen weiterhin nicht abschließend geklärt: zum einen kennt man nicht mit voller Gewissheit die virale Route im menschlichen Körper [86]. Es ist umstritten, wo (anatomisch gesehen) potenzielle Veränderungsschritte im Virus ablaufen. Weiterhin ist unklar, ob diese Veränderungsschritte in den verschiedenen Körperkompartimenten (Blut, Liquor bzw. ZNS) unabhängig ablaufen oder eine Interaktion und Kommunikation zwischen den "Räumen" hinsichtlich der viralen Dissemination stattfindet. Mithilfe der Sanger- und Tiefensequenzierung wurde versucht, diese Fragestellungen zu beantworten. Kennt man die genaue virale Route, würde dies einen elementaren Zugewinn an Wissen hinsichtlich dieser Erkrankung darstellen und langfristig könnte man Therapeutika gezielter abstimmen bzw. entwickeln und auch präventiv besser vorgehen.

Zudem sollte im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden, ob und welche funktionalen Auswirkungen – insbesondere in Hinblick auf Virusreplikation und Genexpression - mögliche Veränderungen in der NCCR haben. Im Zusammenspiel hat diese Arbeit als längerfristiges Ziel, bestimmte Mutationen in der NCCR aus dem JCV in Liquor bzw. Serum von PML-Patienten zu definieren, die eine prognostische Aussage über den Verlauf der Erkrankung ermöglichen.

Im Rahmen der Sangersequenzierung hat man die JCV-NCCR in der jeweiligen Probe untersucht und ihre Basen- und Sequenzblockabfolge bestimmt. Sie wurde nach dem Archetypschema annotiert und im Anschluss mit dem Archetyp und – wenn eine zugehörige Serum- oder Liquorprobe vorlag – auch mit dieser verglichen.

Bei 25 der 26 untersuchten Sequenzen konnte man nicht die Archetypsequenz (a-b-c-d-e-f) detektieren, es lagen in der Regel größere *Rearrangements*, Insertionen, Deletionen und Duplikationen der Sequenzblöcke bzw. Sequenzblockanteile vor. Dieses Ergebnis unterstreicht die bereits von anderen Autoren aufgestellte Erklärung, dass eine Veränderung der NCCR hin zur "PML-Typ-NCCR "für das Auftreten/Entstehen der PML stark förderlich, wenn nicht sogar notwendig ist. Es gibt also eine starke Assoziation zwischen den veränderten JCV-NCC-Regionen (in Liquor- und Serumproben) und der Manifestation der PML, wie bereits von anderen Autoren beschrieben [42, 85, 227]. Bei den hier detektierten Sequenzen handelt es sich vornehmlich um Sequenzen des IIR-Typs, also mit Insertionen und *Repeats*. Die Serumsequenzen von Patient #15 und #16 bilden allerdings hier eine

Ausnahme: bei Patient 16 konnte der Archetyp nachgewiesen werden (also Sequenz des IIS-Typs; singulär mit Insertionen). Im Serum des Patient Nr. 15 wurde ebenfalls eine IIS-Typ-Sequenz beobacht, allerdings fehlte hier ein Anteil des Sequenzblocks d. Ansonsten war die Sequenz aufgebaut wie der Archetyp.

Die überwiegende Anzahl an Patientensequenzen zeigten Insertionen bzw. Repeats/Duplikationen wie die meisten in der Literatur beschriebenen NCCR-Sequenzen von PML-Patienten im Liquor bzw. Serum [85]. Hier konnte v.a. eine Duplikation der Sequenzblöcke bzw. Sequenzblockanteile von c und e beobachtet werden und in vielen Patientensequenzen eine partielle bzw. komplette Deletion von Sequenzblock d. Liegt ein bestimmter Sequenzblock dupliziert vor, dann findet man in der Regel die gleichen Punktmutationen, Einzelnukleotidveränderungen bzw. spezifische Deletionen von mehreren Basenpaaren in beiden Sequenzblöcken. Dies spricht dafür, dass intrasequenzielle Prozesse, die Deletionen bzw. Einzelnukleotidveränderungen (Punktmutationen, Deletion oder Insertion von einer Base) umfassen, zeitlich gesehen vor der Duplikation von Sequenzblöcken/Sequenzblockabschnitten stehen - für umfassendere Deletionen wurde dies bereits vorher beschrieben [224, 240, 241]. Beispielsweise spielt Sequenzblock c eine elementare Rolle als Bindestelle für Transkriptionsfaktoren der NF1-Familie, die die Transkription der viralen Proteine (und somit auch die generelle Replikationsfähigkeit des Virus und seine Virulenz) fördern. Interessanterweise war keine Sequenz aufgebaut wie die "NCCR-Protoytp-MAD1-Sequenz". Die MAD1-Sequenz zeichnet sich durch die Sequenzblockabfolge a-c-e-a-c-e-f aus, enthält also mehrere Tandem-Repeats sowie vollständige Deletionen von Block b und d. Die MAD1-Sequenz wurde als erste Sequenz aus dem ZNS eines PML-Patienten isoliert und sequenziert und gilt als "Prototyp-NCCR-PML-Sequenz". Gemeinsamkeiten zu dieser wurden in der vorliegenden Arbeit beobachtet: bei fast allen Sequenzen duplizierte Sequenzblock(anteile) von c und e sowie ein vollständiges/partielles Fehlen von d. Ebenso aber auch Unterschiede: so fehlte bei keiner einzigen Patientensequenz der vollständige Block b und auch bei keiner war der vollständige Block a dupliziert (wie bei der MAD1-Variante). Diese Beobachtungen überschneiden sich mit denen anderer Autoren, die die MAD1-Variante eher als "atypische" NCCR-Variante betrachten und diese tendenziell nur als Vergleichsgrundlage für NCCR-Patientensequenzen nutzen [28].

Dadurch, dass bei einem PML-Patienten im Serum allerdings "nur" der Archetyp nachweisbar war, kann man nicht die These aufstellen, dass die Veränderungen in der NCCR hin zur "PML-Typ-NCCR" bei allen PML-Patienten notwendig für das Erscheinungsbild dieser fatalen, neurologischen Erkrankung sind. Möglicherweise haben andere Begleitumstände (z.B. sehr starke Immunsuppression, Behandlung mit spezifischen Medikamenten etc.) bei diesem Patienten mit der Archetypsequenz eine Veränderung der NCCR zur meist aggressiveren und neurovirulenteren PML-Typ-Form überflüssig gemacht. Denkbar ist allerdings auch, dass im Serum des Patienten die Archetypsequenz die dominierende war, allerdings im Liquor eine zum Archetyp unterscheidbare NCCR-Variante vorlag. Leider konnte keine zu diesem Patienten zugehörige Liquorprobe untersucht werden, dementsprechend lassen sich hier nur die o.g. Vermutungen aufstellen.

4.1 NCCR-Sangersequenzierung

Bei der Sangersequenzierung konnte man bei 7 der 10 Probenpaare eine identische JCV-NCCR-Sequenz finden, bei 3 hingegen waren nicht identische NCCR-Varianten detektierbar. Dieses nichteinheitliche Bild bzgl. der Verteilung der Consensussequenzen lässt verschiedene Interpretationsansätze zu. Die 7 Liquor-Serum-Probenpaare mit identischer NCCR sprechen für eine virale Dissemination zwischen Blut/Peripherie und zentralem Nervensystem und für eine enge "Kommunikation" dieser beiden Körperkompartimente – ähnliche Untersuchungen mit weniger Liquor-Serum-Paaren von PML-Patienten zeigten vergleichbare Ergebnisse [86]. Die exakte Beschreibung der viralen Route im menschlichen Körper ist weiterhin nicht abschließend geklärt. Die 7 Probenpaare mit identischer Consensussequenz unterstützen allerdings die These, dass in der Peripherie Rearrangements und Veränderungen in der NCCR aufkommen und dort die "PML-Typ-NCCRs" entstehen und von da aus ins zentrale Nervensystem wandern. Eine Veränderung solcher Art geschieht vermutlich im Knochenmark oder in den B-Lymphozyten, in denen durch die VDJ-Umlagerung solche Mutationen begünstigt werden. Die VDJ-Umlagerung ist ein natürlich ablaufender Prozess im menschlichen Körper und stellt durch DNA-Um- und "gewünschter" und Anlagerungsprozesse den Schlüsselmechanismus zur Herstellung der Antikörperdiversität dar. Unterschiedliche DNA-Abschnitte werden dabei zufällig zusammengesetzt bzw. rekombiniert - die Regionen, die für die variablen antigenbindenden Stellen an den humanen Antikörpern kodieren, sind konkret die s.g. V- (variable), D- (diversity) oder J-Gene (joining) [242]. Diese VDJ-Rekombination umfasst einerseits die zufällige Selektion eines Paares von V-, D- und J-Segmenten; andererseits aber auch die bewusste Induktion von Doppelstrangbrüchen neben jedem Segment, um dort DNA-Teilstücke zu deletieren, einzufügen oder zu invertieren, um abschließend eine Ligatur der benachbarten Segmente und einen durchgehenden und vollständigen DNA-Doppelstrang zu erreichen [242]. Die Möglichkeit einer V(D)J-ähnlichen Rekombination mit Umlagerungs-, Duplikations-, Deletions- und Insertionsprozessen, an den virale Sequenzen (in diesem Fall die NCCR des JC-Virus) beteiligt sind, in Kombination mit anderen DNA-Replikationsgetriebenen Rekombinationsereignissen erscheint an dieser Stelle als Ursprung der "PML-Typ-NCCRs" denkbar und wahrscheinlich [241].

Die veränderte NCCR ermöglicht wahrscheinlich *in vivo* eine höhere Replikationsrate für das Virus, eine verstärkte Neurovirulenz und einen geänderten Gewebetropismus, wie im Rahmen von einzelnen *in vitro* Untersuchungen demonstriert wurde [85, 231]). Zusammen genommen wird dadurch eine JCV-Dissemination im Blut und konsekutiv im Gehirn erreicht. Umgekehrt wäre auch ein Veränderungsprozess im ZNS bzw. ein Adaptationsprozess an das umgebende Gewebe und die dortigen Transkriptionsfaktoren möglich und von da aus eine konsekutive Verbreitung des JC-Virus mit PML-Typ-NCCR in die Peripherie denkbar. Die identischen Consensussequenzen deuten jedenfalls auf "kommunizierende" und interagierende anatomische Körperkompartimente hinsichtlich der viralen Dissemination im Rahmen der viralen Reaktivierung unter Immunsuppression hin. Gleichzeitig sprechen sie gegen einen eigenständigen NCCR-Veränderungsprozess jeweils im ZNS bzw. in der Körperperipherie/Blut. Es ist sehr unwahrscheinlich, dass exakt die gleiche NCCR-Variante mit den patientenindividuellen Mutationen in beiden Kompartimenten aus dem Ursprungsarchetyp, der als interpersonelle Transmissionsvariante angenommen wird, entsteht.

Betrachtet man allerdings die ersten 3 Patientenprobenpaare (#1-#3), so zeigen diese nicht-identische Consensussequenzen in Liquor und Serum. Hervorzuheben ist, dass die Unterschiede zwischen der Liquor- und korrespondierender Serumprobe bei diesen 3 Probenpaaren sehr verschieden sind. Bei #1 und #2 zeigt sich – beim Vergleich zwischen Liquor- und Serum-NCC-Region - z.T. ein ganz anderer Aufbau der NCCR mit anderen Sequenzblöcken/Sequenzblockanteilen, vorwiegend im mittleren Bereich der Region. Analysiert man hingegen die Genregionen von #3, so sieht man leichte Abweichung im *ori*-abgewandten Teil der NCCR. Diese Ergebnisse sprechen eher für einen losgelösten, in den verschiedenen Körperregionen eigenständig stattfindenden Veränderungsprozess

der NCCR. Im Rahmen dieses Modells wäre es denkbar, dass das JC-Virus mit der Archetypsequenz bereits im Rahmen der Virämie bei Erstinfektion auch das Gehirn erreicht und das Gehirn als Ort der viralen Latenz dient. Diese These wird durch die Beobachtungen anderer Autoren gestützt, die das JC-Virus im Gehirn gesunder bzw. nicht an der PML erkrankter Patienten isolieren und nachweisen konnten [76-79]. Unter Immunsuppression kommt es dann sowohl in der Körperperipherie (also im Blut, B-Lymphozyten) als auch im Liquor/ZNS zu *Rearrangements*, Mutationen und Veränderungen in der NCCR. Diese Prozesse finden dieser These folgend allerdings unabhängig voneinander statt und es entsteht im ZNS bzw. außerhalb des ZNS jeweils eine dominierende Majorvariante (und weitere Minorvarianten), die optimal an die jeweils dort herrschenden Gewebebedingungen und Transkriptionsfaktoren adaptiert sind.

Dieses nicht-einheitliche Bild der Verteilung der Consensussequenzen könnte dafürsprechen, dass die Pathogenese, die virale Route und der anatomische Ort der NCCR-Veränderungen (Rearrangements, Duplikationen, Deletionen etc.) nicht bei allen PML-Patienten gleich sind. Potenziell erreicht das JC-Virus nicht bei allen Patienten das Gehirn im Rahmen der Erstinfektion und kann dementsprechend nicht bei allen Patienten dort in Latenz ruhen und zu gegebener Zeit reaktivieren. Es ist auch möglich, dass das JCV bei allen Patienten über die Blut-Hirn-Schranke bzw. Blut-Liquor-Schranke im Rahmen der Erstinfektion/Virämie gelangt, dort aber nicht bei allen Patienten von den dortigen Immunzellen wieder eradiziert wird und so das Gehirn als Ort der Latenz nutzen kann. Zudem ist es denkbar, dass manche JCV-NCCR-Varianten "liquorgängiger" bzw. einfacher über die Blut-Hirn-Schranke gelangen als andere. An der Stelle sei erwähnt, dass bei diesen Prozessen auch Mutationen in der Kapsidregion des Virus (VP1-Region) eine Rolle spielen könnten. Diese VP1-Mutationen sind bei PML-Patienten beschrieben [28, 233-236, 243, 244], sind aber nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Bei manchen Patienten könnte so die JCV-Variante, die vormals im Gehirn dominierte, von der "Serum-JCV-NCCR-Variante" verdrängt werden, sodass schlussendlich wieder die "Serum-JCV-Variante" auch im Gehirn dominiert. Verschiedene Modelle sind denkbar und unterschiedliche patienten- und virusspezifische Eigenschaften beeinflussen vermutlich den Prozess der viralen Veränderung und die virale Route.

4.2 NCCR-Tiefensequenzierung

Um die virale Route und den Entstehungsprozess der "PML-Typ-NCCRs" besser verstehen zu können, wurden alle Serum- und Liquorproben mittels Tiefensequenzierung analysiert. Mit dieser Methode gelingt es, potenzielle Minorvarianten der JCV-NCCR zu detektieren.

Die Anzahl und Art der Minorvarianten schwankt stark zwischen den 26 untersuchten Patientenproben – nur bei drei Proben konnten keine Minorvarianten festgestellt werden, bei den verbleibenden 23 teilweise mehrere. Hierbei wurde zwischen Minorvarianten mit einzelnen Nukleotidveränderungen und Minorvarianten mit größeren *Rearrangements* im Vergleich zur zugehörigen Majorvariante unterschieden.

Minorvarianten mit einzelnen Nukleotidveränderungen zeigen exakt den gleichen Aufbau wie die Majorvariante und besitzen lediglich an ein bis zwei Stellen in der Sequenz Punktmutationen, Basenpaardeletionen oder -insertionen im Vergleich zur korrespondierenden Consensussequenz. Die überwiegende Zahl an Minorvarianten mit größeren *Rearranagements* zeigen einen im Vergleich zur zugehörigen Majorvariante sehr ähnlichen Aufbau hinsichtlich der Sequenzblöcke, der Reihenfolge dieser und der Länge an Sequenzblockanteilen – ist der Sequenzblock d in der Majorvariante deletiert, so kommt er in der Regel auch nicht in den Minorvarianten dieser Probe vor. Sind bei Sequenzblock c in der Majorvariante die letzten 30bp deletiert, so kommt meist genau dieser Sequenblockabschnitt c mit der Deletion der letzten 30bp auch in den Minorvarianten vor. Häufig konnte eine Variante, die spezifische Deletionen von Sequenzblöcken/Sequenzblockanteilen im Vergleich zur Majorvariante enthielt und dementsprechend kürzer von der Basenpaarlänge war, nachgewiesen werden. Zum anderen wurde auch häufig eine "längere" Minorvariante (im Vergleich zur korrespondierenden Consensussequenz) mit entsprechenden Insertionen detektiert. Die "Ähnlichkeit" der Minorvarianten im Vergleich zur zugehörigen Majorvariante spricht stark dafür, dass diese im Rahmen eines Veränderungs- oder Selektionsprozesses aus der Majorvariante entstanden sind bzw. allen Varianten eine gleiche "Basis" zugrunde liegt, von der aus Veränderungen in der NCCR ablaufen. Hinsichtlich der Pathogenese scheint also eine "PML-Typ-NCCR" zu entstehen, aus der sich dann entsprechend dominierende Majorvarianten bzw. untergeordnete Minorvarianten entwickeln. Diese Hypothesen werden v.a. durch die Analyse der Minorvarianten bei den Patientenprobenpaaren mit unterschiedlicher Consensussequenz gestützt. Insbesondere bei Patient 2 kann man den klaren Unterschied zwischen den Serumminorvarianten und den Liquorminorvarianten erkennen, die ihrer entsprechenden Majorvariante vom Aufbau und der Sequenzblockabfolge sehr stark ähneln. Ob Minorvarianten im Rahmen eines Selektions- bzw. Adaptationsprozesses entstehen oder es sich hierbei um "zufällige" Fehler im Rahmen der homologen Rekombination handelt, kann man nicht mit abschließender Gewissheit beantworten. Es kann zumindest festgehalten werden, dass bei der "Entwicklung" von Minorvarianten eine ähnliche Technik virustechnisch genutzt wird wie bei der initialen Entstehung einer "PML-Typ-NCCR"-Variante bzw. der Majorvariante. Eine Ausnahme bildet die Archetyp-ähnliche Minorvariante aus der Liquorprobe von Patient 11, die keine direkte Ähnlichkeit zur korrespondierenden Majorvariante aufzeigt. Dass diese nicht artifiziell, z.B. im Rahmen einer Kontamination entstanden ist, ist ist an der Punktmutation in Sequenzblock b zu erkennen, die man auch bei der Majorvariante und bei 3 der 4 anderen Minorvarianten findet. Diese Konstellation ist insofern sehr interessant, als dass sie die bisherige Vermutung untermauert, dass die Archetyp-Sequenz sehr wahrscheinlich die von Mensch zu Mensch (bzw. mit dem Zwischenschritt aus der Umwelt) übertragene/transmittierte Form ist, aus der sich im ZNS bzw. im Serum die veränderte "PML-Typ-Sequenz" entwickelt.

Einzelne Punktmutationen (bzw. Basenpaarveränderungen wie Basenpaarinsertionen oder -deletionen) entstehen vermutlich – ähnlich wie bei menschlicher DNA – im Rahmen der Replikation durch DNA-Ablesefehler oder sind verursacht durch äußere Einflüsse (z.B. UV-Strahlung, ionisierende Strahlung etc.).

Die unterschiedlichen Minorvarianten und die differierende Art und Anzahl dieser in jeder einzelnen Patientenprobe spricht jedenfalls für einen hochkomplexen, dynamischen und sehr patientenindividuellen Prozess der Virus(weiter)entwicklung.

Bei 3 Proben konnten keine Minorvarianten detektiert werden. Dies kann mehrere mögliche Gründe haben. Zum einen ist es denkbar, dass die Minorvarianten im Laufe des Krankheitsprozesses von der optimal an die Umgebung angepasste Majorvariante "verdrängt" werden und so ab einem gewissen Zeitpunkt nicht mehr nachgewiesen werden können. Umgekehrt ist es auch möglich, dass erst im Rahmen der klinisch apparenten PML, der massiven Infektion von Oligodendrozyten und der fulminanten lytischen Replikation die Replikationsrate so hoch ist, dass dies das Auftreten von Fehlern während der Replikation bzw. der homologen Rekombination eher begünstigt. Da bei PML-Patienten die Diagnose manchmal erst verzögert gestellt werden kann (aufgrund von untypischen Symptomen, verzögertem *Onset* der Symptome, unterschiedliche Verfügbarkeit an JCV-PCR etc.), ist keine direkte Vergleichbarkeit der untersuchten Proben hinsichtlich des klinischen und pathologischen Stadiums der PML und des Progresses der Erkrankung gegeben.

Bei dem Vergleich zwischen den im Liquor gefundenen NCCR-Minorvarianten und denen aus der entsprechenden Serumprobe muss man die Probenpaare mit gleicher bzw. unterschiedlicher Consensussequenz zunächst getrennt betrachten bzw. beurteilen. Bei den Patientenprobenpaaren mit gleicher Majorvariante in Liquor und Serum lässt sich festhalten, dass in beiden untersuchten Körperflüssigkeiten mindestens eine, manchmal sogar auch zwei identische Minorvarianten detektiert wurden, die sowohl in Liquor als auch im Serum zu finden waren. Diese waren meist im Vergleich zur dominierenden Majorvariante verkürzt und wiesen die gleiche Sequenzblockabfolge (nur eben mit Deletionen) auf. Wenn eine zweite identische Minorvariante beobachtet werden konnte, dann war diese meist durch Repeats bzw. Insertionen von Sequenzblockanteilen im Vergleich zur Majorvariante verlängert. Aber auch hier ist die starke Ähnlichkeit zur korrespondierenden Consensussequenz im Sinne der Sequenzblockteile und deren Reihenfolge klar zu erkennen. Einige Minorvarianten konnten auch nur im Liquor, wenige nur im Serum nachgewiesen werden. Zum Teil wiesen diese nur einzelne Nukleotidveränderungen auf (vermutlich durch Lesefehler während der Replikation). Zum Teil waren es auch Sequenzen mit größeren Insertionen und Deletionen, die aber noch eindeutig von der zugehörigen Majorvariante abzuleiten waren. Generell unterstreicht das Vorkommen von identischen Minorvarianten in Liquor und Serum die aufgestellte Hypothese, dass es eine starke "Verbindung" bzw. "Kommunikation" zwischen ZNS und Körperperipherie bzw. Serum gibt, die in Bezug auf die virale Dissemination und virale Route im engen Kontakt stehen. Die lediglich in einem Körperkompartiment zu findenden Varianten stellen vermutlich eine versuchte, optimale und unabhängige Anpassung des JC-Virus an die jeweilige Umgebung dar bzw. sind Ausdruck eines in beiden Kompartimenten stattfindenden Selektionsprozesses.

Betrachtet man die Probenpaare mit unterschiedlicher JCV-NCCR in Serum und Liquor (Patient 1, 2 und 3), so lässt sich bei jedem Probenpaar eine Besonderheit feststellen. Bei #1 konnte keine Minorvariante im Serum detektiert werden, die Liquor-Minorvarianten hatten sehr große erkennbare Ähnlichkeit zur Liquor-Majorvariante. Bei #2 konnten in beiden Proben mehrere Minorvarianten festgestellt werden, die wiederum in ihrem Aufbau der zugehörigen Liquorbzw. Serumconsensussequenz stark ähnelten. Beim 3. Patienten waren die Major- und Minorvarianten im Liquor bis auf wenige Mutationen in der Region c fast identisch, im Serum war dann aber die Liquor-Minorvariante dominierend und die Liquor-Majorvariante nicht nachweisbar. Die Ergebnisse von Patient 2 sprechen eher für einen in beiden Körperkompartimenten unabhängig stattfindenden Entwicklungs- und Adaptationsprozess der JCV-NCCR-Varianten. Betrachtet man allerdings die Analysen der NCC-Regionen von Patient 3, so könnten diese die vermutete hämatogene virale Route durchaus untermauern. Im Rahmen der Immunsuppression kommt es zur Reaktivierung des JCV mit der Archetypsequenz aus dem Urogenitaltrakt bzw. zu Veränderungsprozessen im Knochenmark bzw. in B-Lymphozyten [85]. Die im Serum aus dem Archetyp durch Rearrangements gebildete Serummajorvariante wandert aufgrund ihrer gesteigerten Virulenz über die Blut-Hirn-Schranke und letzten Schritt an das geänderte Gewebe adaptiert sich im bzw. die anderen Gewebetranskriptionsfaktoren. Bei einigen JCV-Varianten ist dies in Teilen notwendig (wie bei #3), bei vielen aber auch nicht (#4-#10).

Das nicht-einheitliche Bild bzgl. der Verteilung der Minorvarianten spiegelt die bereits durch die Sangersequenzierung gewonnene Erkenntnis bzw. vermutete Hypothese wider – nämlich, dass nicht angenommen werden kann, dass der Krankheitsprozess, die virale Route, der Entstehungsort der Liquor- bzw. Serumminorvarianten sowie deren Dissemination in verschiedene Körperkompartimente bei allen PML-Patienten gleich ist.

In der Literatur konnte keine Untersuchung gefunden werden, die - wie bei der vorliegenden Studie so viele korrespondierende PML-Patientenprobenpaare für die Bestimmung von Major- und Minorvarianten zur Verfügung hatte [86] - verschiedene Arbeitsgruppen untersuchten eher andere Teile des JC-Virus mittels Tiefensequenzierung, z.B. das VP1-Protein oder das große T-Antigen [245, 246]. Dies liegt u.a. an der niedrigen Inzidenz der PML, die den Zugriff auf so viele Proben von PML-Patienten erschwert. Die untersuchte Probenanzahl und die daraus gezogenen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind deshalb aussagekräftiger bzgl. des aktuellen Wissenstands und lassen zusammengefasst folgende Schlussfolgerungen zu: zum einen scheint die Veränderung der NCCR hin zur "PML-Typ-NCCR" förderlich bzw. notwendig für die Entstehung und Entwicklung der progressiven multifokalen Leukenzephalopathie. Zum anderen spricht das nicht-einheitliche Verteilungsmuster der Consensussequenzen in Serum und Liquor dafür, dass der Krankheitsprozess nicht bei allen PML-Patienten gleich ist. Das Vorkommen z.T. unterschiedlicher Minorvarianten in Liquor und Serum spricht für einen z.T. unabhängigen, in beiden Körperkompartimenten stattfindenden "Selektionsprozess". Zusammen genommen sprechen diese Schlussfolgerungen für einen hochkomplexen Krankheitsprozess. Die genaue Entstehung der NCCR-Mutanten und der Ätiologie konnte nicht abschließend geklärt werden und gibt Hinweise auf verschiedene mögliche Theorien, die man im Rahmen noch größer angelegter Studien bestätigen oder falsifizieren kann.

4.3 Messung der Genexpression mittels FACS-Analyse

Im dritten Teil der vorliegenden Untersuchung sollten die molekular gefundenen Unterschiede der NCCR hinsichtlich funktionaler Auswirkungen getestet werden. Die Transfektion der patientenindividuellen NCCR in ein bidirektionales Reporterplasmid ermöglicht die Analyse von früher und später Promotoraktivität in einem Versuchsansatz.

Hinsichtlich der frühen Aktivität zeigt sich in fast allen Proben eine signifikante Steigerung im Vergleich zur frühen Promotoraktivität der Archetypsequenz. "Einfachere" Rearrangements bzw. Deletionen/Insertionen in der NCCR zeigten ähnliche Steigerungseffekte wie hochkomplexe Veränderungen in der Region. Keine Steigerung wurde bei der Serum-NCCR von #16 beobachtet, da diese ja der Archetypsequenz entspricht. Auch bei #14 in der Serum-JCV-NCCR-Probe konnte keine signifikante Steigerung in der durchflusszytometrischen Auswertung detektiert werden - dies ist insofern verwunderlich, da die Seguenz eine vollständige Deletion des Seguenzblocks d aufweist und eine ähnliche Struktur wie die MAD1-Sequenz besitzt (Tandem-Repeats von e und einem Teil von c). Die durchgehend bei fast allen Proben beobachtete Steigerung der frühen Promotoraktivität der JCV-Patientensequenzen gegenüber dem Archetypniveau deckt sich mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die auch eher eine Steigerung der frühen als der späten Promotoraktivität zeigen konnten [85, 231]. Die Varianz hinsichtlich der vermehrten frühen Expression war sehr groß - die Proben mit der größten Steigerung wiesen alle eine (fast) vollständige Deletion des Sequenzblock d auf. Zwar konnten auch Promotoraktivitätssteigerungen bei JCV-NCCR-Sequenzen mit Sequenzblock d beobachtet werden (allerdings eher im mittleren bis unteren Drittel), ebenso wie auch nicht besonders starke Aktivitätssteigerungen bei Sequenzen mit vollständiger Deletion von d gesehen wurden. Zusammengenommen unterstreichen diese Beobachtungen den bereits von anderen Autoren beschriebenen replikations- und transkriptionsfördernden Effekt der Deletion von Sequenzblock d [85, 224, 247].

Hinsichtlich der späten Promotoraktivität zeigt sich ein ähnliches Bild – auch hier kam es bei der überwiegenden Anzahl an Patienten-NCCR zu einer signifikanten Steigerung gegenüber dem Archetyplevel. Allerdings konnte hier – im Gegensatz zur frühen Promotoraktivität – bei wenigen Proben auch ein signifikanter Abfall der späten Promotoraktivität im Vergleich zum Archetyp beobachtet werden. Interessanterweise waren das genau die JCV-NCCR-Sequenzen (nämlich #1 CSF, #9 CSF, #9 S, #14 S und #15 S), die größere Anteile des Sequenzblocks d enthielten. Die Abnahme der späten Promotoraktivität im Vergleich zum Archetypaktivitätslevel konnte von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden [85] – interessant bei den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung ist allerdings, dass diese Abnahme genau bei den Sequenzen mit "verbliebenen" Sequenzblock d detektiert werden kann und die Sequenzen mit vollständiger bzw. fast vollständiger Deletion von d diese Promotoraktivitätsabnahme nicht zeigten, sondern hier eine Zunahme beobachtet werden konnte. Dies spricht nochmals für die Bedeutung des Blocks d im Rahmen der viralen Replikation und Transkription (früh und spät) und zeigt auf, dass durch die Deletion von Sequenzblock d replikations- bzw. transkriptionsinhibierende Elemente entfernt werden.

Betrachtet man die frühen und späten Promotoraktivitäten bei den Patientenprobenpaaren mit unterschiedlicher Consensussequenz, so lässt sich erkennen, dass beide Aktivitätslevel (also frühe und späte Genexpression) der Liquorproben bzw. der Liquor-NCCR-Sequenzen von Patient 2 und 3 über denen der Serumsequenz liegen. Lediglich bei Patient 1 ist das Bild vertauscht, hier liegen beide Promotoraktivitätsniveaus der Serumprobe über denen der Liquorprobe. Erklärbar ist dies u.a. an der Sequenz selbst. In der Liquorsequenz von #1 liegen zwei Tandem-Repeats von Anteilen des Sequenzblocks d, der - wie oben bereits beschrieben - vermutlich replikations- und transkriptionsvermindernde Elemente bzw. Bindestellen für inhibierende Transkriptionsfaktoren trägt. Beim Vergleich der Promotoraktivitäten der Patientenprobenpaare mit identischer Consensussequenz zeigt sich ein heterogenes Bild. Die Aktivitäten von JCV-NCCR-Varianten mit identischer NCCR liegen meist auf einem ähnlichen, aber nicht exakt gleichen Niveau. Mal zeigt die Liquorvariante eines Patienten ein höheres Aktivitätslevel, mal die Serumprobe. Hier kann man keinen einheitlichen Trend erkennen. Aus der Beobachtung, dass Proben mit identischer Consensussequenz keine exakt gleichen Aktivitätslevel in vitro zeigen, kann man folgende Erklärungshypothesen schlussfolgern: zum einen ist es möglich, dass sich identische DNA unterschiedlich räumlich anordnen kann und so die Bindung von möglichen Transkriptionsfaktoren positiv wie negativ beeinflussen kann. Diese Hypothese ist vor allen Dingen in vivo bei einer Vielzahl von möglichen Transkriptionsfaktoren nicht zu vernachlässigen. Zum anderen ist es auch denkbar, dass es weitere, transkriptionsbeeinflussende Faktoren gibt, die bisher nicht bzw. unzureichend bekannt sind. Aussagen, die aus in-vitro-Experimenten gezogen werden können, sind grundsätzlich nicht 1:1 auf die Situation in vivo zu übertragen, deswegen bleibt es fraglich, inwieweit man aus den unterschiedlichen Aktivitätsleveln der verschiedenen JCV-NCCR-Proben einzelne Rückschlüsse auf die Replikations- und Transkriptionsfähigkeit und deren Steigerung in vivo ziehen kann. Grundsätzlich lässt sich aber festhalten, dass durch unterschiedliche Rearrangements, Insertionen, Deletionen, Tandem-Repeats und Einzelnukleotidveränderungen eine signifikante Steigerung der frühen und späten Promotoraktivität in vitro beobachtet werden kann. Diese Grundaussage lässt sich mit großer Sicherheit auch auf die in vivo Situation übertragen und erklärt, warum das JC-Virus diese Veränderungen in der NCCR im Rahmen der PML aufweist.
4.4 Zusammenfassende Bewertung

Die vorliegende Arbeit beantwortet nicht alle offenen Fragen rund um das JCV und die Pathophysiologie der PML. Durch die umfangreiche, zur Verfügung stehende JCV-Probensammlung von PML-Patienten und durch die erstmalige Kombination von Sanger-, Tiefensequenzierung und durchflusszytometrischer Analyse von 26 Proben (inklusive 10 Probenpaaren) konnten Vermutungen bzw. Beobachtungen anderer Autoren bestätigt werden – die NCCR von dem in Liquor und im Serum isolierten JC-Virus zeigt meist patientenindividuelle, hochkomplexe Rearrangements, Deletionen, Insertionen, Duplikationen und Einzelnukleotidveränderungen. Solche Veränderungsschritte innerhalb dieser nicht-kodierenden Kontrollregion scheinen die PML-Entstehung zu begünstigen, wenn nicht sogar notwendig zu machen. Manche PML-Patienten weisen unterschiedliche NCCR-Sequenzen in Liquor und Serum auf, manche auch identische. Das Verteilungsmuster der detektierten Minorvarianten wurde bislang stark unterschätzt und ist zwischen den Patientenkollektiven mit identischer Consensussequenz in Serum und Liquor und denen mit unterschiedlicher Consensussequenz verschieden. Im Rahmen der Tiefensequenzierung und Expressionsanalyse in der Durchflusszytometrie konnte in vitro gezeigt werden, dass die verschiedenen Veränderungen innerhalb der NCCR direkte Auswirkungen auf die frühe und späte Promotoraktivität haben und bei fast allen Proben eine signifikante Steigerung dieser Aktivität im Vergleich zum Genexpressionslevel des Archetyps beobachtet werden konnte. Zusammengefasst kann man sagen, dass diese Ergebnisse neue Hinweise auf die virale Route des JC-Virus innerhalb des menschlichen Körpers geben und vermuten lassen, dass der Krankheitsprozess und der Entstehungsprozess der NCCR-Varianten nicht bei allen (PML)-Patienten gleich ist. Diese Hypothese gilt es im Rahmen weiterer Studien noch näher zu beleuchten. Erst, wenn man die genaue Pathophysiologie dieser lebensbedrohlichen Erkrankung und die Entwicklung ihres ätiologischen Verursachers kennt und versteht, kann man anhand von spezifischen Daten prognostische Aussagen treffen und zielgerichtete Therapeutika entwickeln.

5 Literatur und Quellenverzeichnis

- 1. Padgett, B.L., et al., Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. Lancet, 1971. 1(7712): p. 1257-60.
- Melnick, J.L., [Group of the Papovaviruses, with Special Reference to the Simian Virus Sv 40].
 Stud Cercet Inframicrobiol, 1964. 15: p. 3-20.
- 3. Melnick, J.L., et al., Papovaviridae. Intervirology, 1974. 3(1-2): p. 106-20.
- 4. Fauquet, C.M. and M.A. Mayo, The 7th ICTV report. Arch Virol, 2001. 146(1): p. 189-94.
- 5. Polyomaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of, V., et al., A taxonomy update for the family Polyomaviridae. Arch Virol, 2016. 161(6): p. 1739-50.
- 6. Moens, U., et al., ICTV Virus Taxonomy Profile: Polyomaviridae. J Gen Virol, 2017. 98(6): p. 1159-1160.
- 7. Gardner, S.D., et al., New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. Lancet, 1971. 1(7712): p. 1253-7.
- 8. Allander, T., et al., Identification of a third human polyomavirus. J Virol, 2007. 81(8): p. 4130-6.
- 9. Gaynor, A.M., et al., Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. PLoS Pathog, 2007. 3(5): p. e64.
- 10. Feng, H., et al., Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. Science, 2008. 319(5866): p. 1096-100.
- 11. Schowalter, R.M., et al., Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin. Cell Host Microbe, 2010. 7(6): p. 509-15.
- 12. van der Meijden, E., et al., Discovery of a new human polyomavirus associated with trichodysplasia spinulosa in an immunocompromized patient. PLoS Pathog, 2010. 6(7): p. e1001024.
- 13. Scuda, N., et al., A novel human polyomavirus closely related to the african green monkeyderived lymphotropic polyomavirus. J Virol, 2011. 85(9): p. 4586-90.
- 14. Buck, C.B., et al., Complete genome sequence of a tenth human polyomavirus. J Virol, 2012. 86(19): p. 10887.
- 15. Lim, E.S., et al., Discovery of STL polyomavirus, a polyomavirus of ancestral recombinant origin that encodes a unique T antigen by alternative splicing. Virology, 2013. 436(2): p. 295-303.
- 16. Korup, S., et al., Identification of a novel human polyomavirus in organs of the gastrointestinal tract. PLoS One, 2013. 8(3): p. e58021.
- 17. Mishra, N., et al., Identification of a novel polyomavirus in a pancreatic transplant recipient with retinal blindness and vasculitic myopathy. J Infect Dis, 2014. 210(10): p. 1595-9.
- 18. Hirsch, H.H. and J. Steiger, Polyomavirus BK. Lancet Infect Dis, 2003. 3(10): p. 611-23.
- 19. Arthur, R.R., et al., Association of BK viruria with hemorrhagic cystitis in recipients of bone marrow transplants. N Engl J Med, 1986. 315(4): p. 230-4.
- 20. Bogdanovic, G., et al., Presence of human polyomavirus DNA in the peripheral circulation of bone marrow transplant patients with and without hemorrhagic cystitis. Bone Marrow Transplant, 1996. 17(4): p. 573-6.
- 21. Mylonakis, E., et al., BK virus in solid organ transplant recipients: an emerging syndrome. Transplantation, 2001. 72(10): p. 1587-92.
- 22. Hogan, T.F., et al., Human polyomavirus infections with JC virus and BK virus in renal transplant patients. Ann Intern Med, 1980. 92(3): p. 373-8.
- 23. Binet, I., et al., Polyomavirus disease under new immunosuppressive drugs: a cause of renal graft dysfunction and graft loss. Transplantation, 1999. 67(6): p. 918-22.

- 24. Haycox, C.L., et al., Trichodysplasia spinulosa--a newly described folliculocentric viral infection in an immunocompromised host. J Investig Dermatol Symp Proc, 1999. 4(3): p. 268-71.
- 25. Wu, J.H., et al., Molecular insight into the viral biology and clinical features of trichodysplasia spinulosa. Br J Dermatol, 2016. 174(3): p. 490-8.
- 26. Toker, C., Trabecular carcinoma of the skin. Arch Dermatol, 1972. 105(1): p. 107-10.
- 27. Engels, E.A., et al., Merkel cell carcinoma and HIV infection. Lancet, 2002. 359(9305): p. 497-8.
- 28. Ferenczy, M.W., et al., Molecular biology, epidemiology, and pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy, the JC virus-induced demyelinating disease of the human brain. Clin Microbiol Rev, 2012. 25(3): p. 471-506.
- 29. Chen, X.S., T. Stehle, and S.C. Harrison, Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry. EMBO J, 1998. 17(12): p. 3233-40.
- 30. Salunke, D.M., D.L. Caspar, and R.L. Garcea, Self-assembly of purified polyomavirus capsid protein VP1. Cell, 1986. 46(6): p. 895-904.
- 31. Haley, S.A. and W.J. Atwood, Progressive Multifocal Leukoencephalopathy: Endemic Viruses and Lethal Brain Disease. Annu Rev Virol, 2017. 4(1): p. 349-367.
- 32. Frisque, R.J., G.L. Bream, and M.T. Cannella, Human polyomavirus JC virus genome. J Virol, 1984. 51(2): p. 458-69.
- 33. Ambrose, C., et al., Location of nucleosomes in simian virus 40 chromatin. J Mol Biol, 1990. 214(4): p. 875-84.
- 34. Trowbridge, P.W. and R.J. Frisque, Identification of three new JC virus proteins generated by alternative splicing of the early viral mRNA. J Neurovirol, 1995. 1(2): p. 195-206.
- 35. Frisque, R.J., Structure and function of JC virus T' proteins. J Neurovirol, 2001. 7(4): p. 293-7.
- 36. White, M.K. and K. Khalili, Pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathyrevisited. J Infect Dis, 2011. 203(5): p. 578-86.
- 37. Assetta, B. and W.J. Atwood, The biology of JC polyomavirus. Biol Chem, 2017. 398(8): p. 839-855.
- 38. Atkinson, A.L. and W.J. Atwood, Fifty Years of JC Polyomavirus: A Brief Overview and Remaining Questions. Viruses, 2020. 12(9).
- Pietropaolo, V., et al., John Cunningham virus: an overview on biology and disease of the etiological agent of the progressive multifocal leukoencephalopathy. New Microbiol, 2018. 41(3): p. 179-186.
- 40. Wollebo, H.S., et al., Persistence and pathogenesis of the neurotropic polyomavirus JC. Ann Neurol, 2015. 77(4): p. 560-70.
- 41. Yogo, Y., et al., Isolation of a possible archetypal JC virus DNA sequence from nonimmunocompromised individuals. J Virol, 1990. 64(6): p. 3139-43.
- 42. Ault, G.S. and G.L. Stoner, Human polyomavirus JC promoter/enhancer rearrangement patterns from progressive multifocal leukoencephalopathy brain are unique derivatives of a single archetypal structure. J Gen Virol, 1993. 74 (Pt 8): p. 1499-507.
- 43. Caracciolo, V., et al., Role of the interaction between large T antigen and Rb family members in the oncogenicity of JC virus. Oncogene, 2006. 25(38): p. 5294-301.
- 44. Feigenbaum, L., et al., Regulation of the host range of human papovavirus JCV. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. 84(11): p. 3695-8.
- 45. Chen, N.N. and K. Khalili, Transcriptional regulation of human JC polyomavirus promoters by cellular proteins YB-1 and Pur alpha in glial cells. J Virol, 1995. 69(9): p. 5843-8.
- 46. Swenson, J.J. and R.J. Frisque, Biochemical characterization and localization of JC virus large T antigen phosphorylation domains. Virology, 1995. 212(2): p. 295-308.
- 47. Bollag, B., et al., JC virus small T antigen binds phosphatase PP2A and Rb family proteins and is required for efficient viral DNA replication activity. PLoS One, 2010. 5(5): p. e10606.

- 48. Sariyer, I.K., K. Khalili, and M. Safak, Dephosphorylation of JC virus agnoprotein by protein phosphatase 2A: inhibition by small t antigen. Virology, 2008. 375(2): p. 464-79.
- 49. Bollag, B., et al., JC virus T'135, T'136 and T'165 proteins interact with cellular p107 and p130 in vivo and influence viral transformation potential. J Neurovirol, 2006. 12(6): p. 428-42.
- 50. Khalili, K., et al., The agnoprotein of polyomaviruses: a multifunctional auxiliary protein. J Cell Physiol, 2005. 204(1): p. 1-7.
- 51. Del Valle, L. and K. Khalili, Detection of human polyomavirus proteins, T-antigen and agnoprotein, in human tumor tissue arrays. J Med Virol, 2010. 82(5): p. 806-11.
- 52. Suzuki, T., et al., The human polyoma JC virus agnoprotein acts as a viroporin. PLoS Pathog, 2010. 6(3): p. e1000801.
- 53. Seo, G.J., et al., Evolutionarily conserved function of a viral microRNA. J Virol, 2008. 82(20): p. 9823-8.
- 54. Kean, J.M., et al., Seroepidemiology of human polyomaviruses. PLoS Pathog, 2009. 5(3): p. e1000363.
- 55. Stolt, A., et al., Seroepidemiology of the human polyomaviruses. J Gen Virol, 2003. 84(Pt 6): p. 1499-1504.
- 56. Hennes, E.M., et al., Age-Dependent Seroprevalence of JCV Antibody in Children. Neuropediatrics, 2016. 47(2): p. 112-4.
- 57. Egli, A., et al., Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors. J Infect Dis, 2009. 199(6): p. 837-46.
- 58. Taguchi, F., J. Kajioka, and T. Miyamura, Prevalence rate and age of acquisition of antibodies against JC virus and BK virus in human sera. Microbiol Immunol, 1982. 26(11): p. 1057-64.
- 59. Zheng, H.Y., et al., Unambiguous identification of JC polyomavirus strains transmitted from parents to children. Arch Virol, 2004. 149(2): p. 261-73.
- 60. Boldorini, R., et al., Latent human polyomavirus infection in pregnancy: investigation of possible transplacental transmission. Pathology, 2008. 40(1): p. 72-7.
- 61. Kitamura, T., et al., Transmission of the human polyomavirus JC virus occurs both within the family and outside the family. J Clin Microbiol, 1994. 32(10): p. 2359-63.
- 62. Hirsch, H.H., et al., European perspective on human polyomavirus infection, replication and disease in solid organ transplantation. Clin Microbiol Infect, 2014. 20 Suppl 7: p. 74-88.
- 63. Bofill-Mas, S. and R. Girones, Role of the environment in the transmission of JC virus. J Neurovirol, 2003. 9 Suppl 1: p. 54-8.
- 64. Bofill-Mas, S., et al., Analysis of the excreted JC virus strains and their potential oral transmission. J Neurovirol, 2003. 9(4): p. 498-507.
- 65. Berger, J.R., et al., JC virus detection in bodily fluids: clues to transmission. Clin Infect Dis, 2006. 43(1): p. e9-12.
- 66. Cortese, I., D.S. Reich, and A. Nath, Progressive multifocal leukoencephalopathy and the spectrum of JC virus-related disease. Nat Rev Neurol, 2021. 17(1): p. 37-51.
- 67. Kitamura, T., et al., Persistent JC virus (JCV) infection is demonstrated by continuous shedding of the same JCV strains. J Clin Microbiol, 1997. 35(5): p. 1255-7.
- 68. Monaco, M.C., et al., Detection of JC virus DNA in human tonsil tissue: evidence for site of initial viral infection. J Virol, 1998. 72(12): p. 9918-23.
- 69. Bofill-Mas, S., et al., Potential transmission of human polyomaviruses through the gastrointestinal tract after exposure to virions or viral DNA. J Virol, 2001. 75(21): p. 10290-9.
- 70. Dorries, K. and V. ter Meulen, Progressive multifocal leucoencephalopathy: detection of papovavirus JC in kidney tissue. J Med Virol, 1983. 11(4): p. 307-17.
- 71. Houff, S.A., et al., Involvement of JC virus-infected mononuclear cells from the bone marrow and spleen in the pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy. N Engl J Med, 1988. 318(5): p. 301-5.

- 72. Atwood, W.J., et al., Interaction of the human polyomavirus, JCV, with human B-lymphocytes. Virology, 1992. 190(2): p. 716-23.
- 73. Marzocchetti, A., et al., Rearrangement of the JC virus regulatory region sequence in the bone marrow of a patient with rheumatoid arthritis and progressive multifocal leukoencephalopathy. J Neurovirol, 2008. 14(5): p. 455-8.
- 74. Monaco, M.C., J. Shin, and E.O. Major, JC virus infection in cells from lymphoid tissue. Dev Biol Stand, 1998. 94: p. 115-22.
- 75. Chesters, P.M., J. Heritage, and D.J. McCance, Persistence of DNA sequences of BK virus and JC virus in normal human tissues and in diseased tissues. J Infect Dis, 1983. 147(4): p. 676-84.
- 76. Tan, C.S., et al., JC virus latency in the brain and extraneural organs of patients with and without progressive multifocal leukoencephalopathy. J Virol, 2010. 84(18): p. 9200-9.
- 77. Ferrante, P., et al., PCR detection of JC virus DNA in brain tissue from patients with and without progressive multifocal leukoencephalopathy. J Med Virol, 1995. 47(3): p. 219-25.
- 78. Delbue, S., et al., Presence and expression of JCV early gene large T Antigen in the brains of immunocompromised and immunocompetent individuals. J Med Virol, 2008. 80(12): p. 2147-52.
- 79. White, F.A., 3rd, et al., JC virus DNA is present in many human brain samples from patients without progressive multifocal leukoencephalopathy. J Virol, 1992. 66(10): p. 5726-34.
- 80. 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.
- 81. Tan, C.S., et al., Detection of JC virus DNA and proteins in the bone marrow of HIV-positive and HIV-negative patients: implications for viral latency and neurotropic transformation. J Infect Dis, 2009. 199(6): p. 881-8.
- 82. Jensen, P.N. and E.O. Major, Viral variant nucleotide sequences help expose leukocytic positioning in the JC virus pathway to the CNS. J Leukoc Biol, 1999. 65(4): p. 428-38.
- 83. Chapagain, M.L. and V.R. Nerurkar, Human polyomavirus JC (JCV) infection of human B lymphocytes: a possible mechanism for JCV transmigration across the blood-brain barrier. J Infect Dis, 2010. 202(2): p. 184-91.
- 84. Monaco, M.C., et al., JC virus infection of hematopoietic progenitor cells, primary B lymphocytes, and tonsillar stromal cells: implications for viral latency. J Virol, 1996. 70(10): p. 7004-12.
- 85. Gosert, R., et al., Rearranged JC virus noncoding control regions found in progressive multifocal leukoencephalopathy patient samples increase virus early gene expression and replication rate. J Virol, 2010. 84(20): p. 10448-56.
- 86. Van Loy, T., et al., JC virus quasispecies analysis reveals a complex viral population underlying progressive multifocal leukoencephalopathy and supports viral dissemination via the hematogenous route. J Virol, 2015. 89(2): p. 1340-7.
- 87. Yogo, Y., et al., JC virus regulatory region rearrangements in the brain of a long surviving patient with progressive multifocal leukoencephalopathy. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2001. 71(3): p. 397-400.
- 88. Yasuda, Y., et al., Comparison of PCR-amplified JC virus control region sequences from multiple brain regions in PML. Neurology, 2003. 61(11): p. 1617-9.
- 89. Nakamichi, K., et al., Sequential changes in the non-coding control region sequences of JC polyomaviruses from the cerebrospinal fluid of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. Arch Virol, 2013. 158(3): p. 639-50.
- 90. Neu, U., et al., Structure-function analysis of the human JC polyomavirus establishes the LSTc pentasaccharide as a functional receptor motif. Cell Host Microbe, 2010. 8(4): p. 309-19.

- 91. Stroh, L.J., et al., The Greater Affinity of JC Polyomavirus Capsid for alpha2,6-Linked Lactoseries Tetrasaccharide c than for Other Sialylated Glycans Is a Major Determinant of Infectivity. J Virol, 2015. 89(12): p. 6364-75.
- 92. Pho, M.T., A. Ashok, and W.J. Atwood, JC virus enters human glial cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. J Virol, 2000. 74(5): p. 2288-92.
- 93. Elphick, G.F., et al., The human polyomavirus, JCV, uses serotonin receptors to infect cells. Science, 2004. 306(5700): p. 1380-3.
- 94. Assetta, B., et al., 5-HT2 receptors facilitate JC polyomavirus entry. J Virol, 2013. 87(24): p. 13490-8.
- 95. Saribas, A.S., et al., JC virus-induced Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. Future Virol, 2010. 5(3): p. 313-323.
- 96. Seth, P., et al., JC virus induces nonapoptotic cell death of human central nervous system progenitor cell-derived astrocytes. J Virol, 2004. 78(9): p. 4884-91.
- 97. Tan, C.S. and I.J. Koralnik, Progressive multifocal leukoencephalopathy and other disorders caused by JC virus: clinical features and pathogenesis. Lancet Neurol, 2010. 9(4): p. 425-37.
- 98. Wuthrich, C., et al., Fulminant JC virus encephalopathy with productive infection of cortical pyramidal neurons. Ann Neurol, 2009. 65(6): p. 742-8.
- 99. Blake, K., et al., JC virus associated meningoencephalitis in an immunocompetent girl. Arch Dis Child, 1992. 67(7): p. 956-7.
- 100. Koralnik, 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.
- 101. Kazory, A., et al., The first case of JC virus allograft nephropathy. Transplantation, 2003. 76(11): p. 1653-5.
- 102. Ahye, N., et al., The Role of the JC Virus in Central Nervous System Tumorigenesis. Int J Mol Sci, 2020. 21(17).
- 103. Del Valle, L., M.K. White, and K. Khalili, Potential mechanisms of the human polyomavirus JC in neural oncogenesis. J Neuropathol Exp Neurol, 2008. 67(8): p. 729-40.
- 104. Astrom, K.E., E.L. Mancall, and E.P. Richardson, Jr., Progressive multifocal leukoencephalopathy; a hitherto unrecognized complication of chronic lymphatic leukaemia and Hodgkin's disease. Brain, 1958. 81(1): p. 93-111.
- 105. Berger, J.R., et al., PML diagnostic criteria: consensus statement from the AAN Neuroinfectious Disease Section. Neurology, 2013. 80(15): p. 1430-8.
- 106. Cavanagh, J.B., et al., Cerebral demyelination associated with disorders of the reticuloendothelial system. Lancet, 1959. 2(7102): p. 524-9.
- 107. Richardson, E.P., Jr., Progressive multifocal leukoencephalopathy. N Engl J Med, 1961. 265: p. 815-23.
- 108. Zurhein, G. and S.M. Chou, Particles Resembling Papova Viruses in Human Cerebral Demyelinating Disease. Science, 1965. 148(3676): p. 1477-9.
- 109. Silverman, L. and L.J. Rubinstein, Electron microscopic observations on a case of progressive multifocal leukoencephalopathy. Acta Neuropathol, 1965. 5(2): p. 215-24.
- Brooks, B.R. and D.L. Walker, Progressive multifocal leukoencephalopathy. Neurol Clin, 1984.2(2): p. 299-313.
- Holman, R.C., et al., Progressive multifocal leukoencephalopathy in the United States, 1979-1994: increased mortality associated with HIV infection. Neuroepidemiology, 1998. 17(6): p. 303-9.
- Holman, R.C., et al., Epidemiology of progressive multifocal leukoencephalopathy in the United States: analysis of national mortality and AIDS surveillance data. Neurology, 1991. 41(11): p. 1733-6.
- 113. Miller, J.R., et al., Progressive multifocal leukoencephalopathy in a male homosexual with T-cell immune deficiency. N Engl J Med, 1982. 307(23): p. 1436-8.

- 114. Bernick, C. and J.B. Gregorios, Progressive multifocal leukoencephalopathy in a patient with acquired immune deficiency syndrome. Arch Neurol, 1984. 41(7): p. 780-2.
- 115. Major, E.O., et al., Pathogenesis and molecular biology of progressive multifocal leukoencephalopathy, the JC virus-induced demyelinating disease of the human brain. Clin Microbiol Rev, 1992. 5(1): p. 49-73.
- 116. Krupp, L.B., et al., Progressive multifocal leukoencephalopathy: clinical and radiographic features. Ann Neurol, 1985. 17(4): p. 344-9.
- 117. Berger, J.R., et al., Progressive multifocal leukoencephalopathy associated with human immunodeficiency virus infection. A review of the literature with a report of sixteen cases. Ann Intern Med, 1987. 107(1): p. 78-87.
- 118. Berger, J.R., et al., Progressive multifocal leukoencephalopathy in patients with HIV infection. J Neurovirol, 1998. 4(1): p. 59-68.
- 119. Lee, L.M., et al., Survival after AIDS diagnosis in adolescents and adults during the treatment era, United States, 1984-1997. JAMA, 2001. 285(10): p. 1308-15.
- 120. Christensen, K.L., et al., Progressive multifocal leukoencephalopathy deaths in the USA, 1979-2005. Neuroepidemiology, 2010. 35(3): p. 178-84.
- 121. Gasnault, J., et al., Prolonged survival without neurological improvement in patients with AIDS-related progressive multifocal leukoencephalopathy on potent combined antiretroviral therapy. J Neurovirol, 1999. 5(4): p. 421-9.
- 122. Cinque, P., et al., The good and evil of HAART in HIV-related progressive multifocal leukoencephalopathy. J Neurovirol, 2001. 7(4): p. 358-63.
- 123. Post, M.J., et al., CNS-immune reconstitution inflammatory syndrome in the setting of HIV infection, part 1: overview and discussion of progressive multifocal leukoencephalopathyimmune reconstitution inflammatory syndrome and cryptococcal-immune reconstitution inflammatory syndrome. AJNR Am J Neuroradiol, 2013. 34(7): p. 1297-307.
- 124. Kleinschmidt-DeMasters, B.K. and K.L. Tyler, Progressive multifocal leukoencephalopathy complicating treatment with natalizumab and interferon beta-1a for multiple sclerosis. N Engl J Med, 2005. 353(4): p. 369-74.
- 125. Langer-Gould, A., et al., Progressive multifocal leukoencephalopathy in a patient treated with natalizumab. N Engl J Med, 2005. 353(4): p. 375-81.
- 126. Van Assche, G., et al., Progressive multifocal leukoencephalopathy after natalizumab therapy for Crohn's disease. N Engl J Med, 2005. 353(4): p. 362-8.
- 127. Miller, D.H., et al., A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. N Engl J Med, 2003. 348(1): p. 15-23.
- 128. Bloomgren, G., et al., Risk of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. N Engl J Med, 2012. 366(20): p. 1870-80.
- 129. Carson, K.R., et al., 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. 4834-40.
- 130. Kothary, N., et al., Progressive multifocal leukoencephalopathy associated with efalizumab use in psoriasis patients. J Am Acad Dermatol, 2011. 65(3): p. 546-551.
- 131. Major, E.O., Progressive multifocal leukoencephalopathy in patients on immunomodulatory therapies. Annu Rev Med, 2010. 61: p. 35-47.
- 132. Neff, R.T., et al., Progressive multifocal leukoencephalopathy and use of mycophenolate mofetil after kidney transplantation. Transplantation, 2008. 86(10): p. 1474-8.
- 133. Carson, K.R., et al., Monoclonal antibody-associated progressive multifocal leucoencephalopathy in patients treated with rituximab, natalizumab, and efalizumab: a Review from the Research on Adverse Drug Events and Reports (RADAR) Project. Lancet Oncol, 2009. 10(8): p. 816-24.

- 134. Kumar, D., T.W. Bouldin, and R.G. Berger, A case of progressive multifocal leukoencephalopathy in a patient treated with infliximab. Arthritis Rheum, 2010. 62(11): p. 3191-5.
- 135. Kartau, M., et al., Progressive Multifocal Leukoencephalopathy: Current Insights. Degener Neurol Neuromuscul Dis, 2019. 9: p. 109-121.
- 136. Iacobaeus, E., et al., The national incidence of PML in Sweden, 1988-2013. Neurology, 2018.90(6): p. e498-e506.
- 137. Bohra, C., L. Sokol, and S. Dalia, Progressive Multifocal Leukoencephalopathy and Monoclonal Antibodies: A Review. Cancer Control, 2017. 24(4): p. 1073274817729901.
- 138. Williamson, E.M. and J.R. Berger, Central Nervous System Infections With Immunomodulatory Therapies. Continuum (Minneap Minn), 2015. 21(6 Neuroinfectious Disease): p. 1577-98.
- 139. 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.
- 140. Sipila, J.O.T., et al., Progressive multifocal leukoencephalopathy in Finland: a cross-sectional registry study. J Neurol, 2019. 266(2): p. 515-521.
- 141. Kartau, M., et al., The Incidence and Predisposing Factors of John Cunningham Virus-Induced Progressive Multifocal Leukoencephalopathy in Southern Finland: A Population-Based Study. Open Forum Infect Dis, 2019. 6(2): p. ofz024.
- 142. Carson, K.R., et al., Progressive multifocal leukoencephalopathy associated with brentuximab vedotin therapy: a report of 5 cases from the Southern Network on Adverse Reactions (SONAR) project. Cancer, 2014. 120(16): p. 2464-71.
- 143. Neil, E.C. and L.M. DeAngelis, Progressive multifocal leukoencephalopathy and hematologic malignancies: a single cancer center retrospective review. Blood Adv, 2017. 1(23): p. 2041-2045.
- 144. Adrianzen Herrera, D., et al., Characteristics and outcomes of progressive multifocal leukoencephalopathy in hematologic malignancies and stem cell transplant a case series. Leuk Lymphoma, 2019. 60(2): p. 395-401.
- 145. d'Arminio Monforte, A., et al., Changing incidence of central nervous system diseases in the EuroSIDA cohort. Ann Neurol, 2004. 55(3): p. 320-8.
- 146. Falco, V., et al., Influence of HAART on the clinical course of HIV-1-infected patients with progressive multifocal leukoencephalopathy: results of an observational multicenter study. J Acquir Immune Defic Syndr, 2008. 49(1): p. 26-31.
- 147. Cinque, P., et al., The effect of highly active antiretroviral therapy-induced immune reconstitution on development and outcome of progressive multifocal leukoencephalopathy: study of 43 cases with review of the literature. J Neurovirol, 2003. 9 Suppl 1: p. 73-80.
- 148. Warnke, C., T. Olsson, and H.P. Hartung, PML: The Dark Side of Immunotherapy in Multiple Sclerosis. Trends Pharmacol Sci, 2015. 36(12): p. 799-801.
- 149. Mateen, F.J., et al., Progressive multifocal leukoencephalopathy in transplant recipients. Ann Neurol, 2011. 70(2): p. 305-22.
- 150. Kharfan-Dabaja, M.A., et al., Two cases of progressive multifocal leukoencephalopathy after allogeneic hematopoietic cell transplantation and a review of the literature. Bone Marrow Transplant, 2007. 39(2): p. 101-7.
- 151. Hadjadj, J., et al., Progressive Multifocal Leukoencephalopathy in Primary Immunodeficiencies. J Clin Immunol, 2019. 39(1): p. 55-64.
- 152. Palazzo, E. and S.A. Yahia, Progressive multifocal leukoencephalopathy in autoimmune diseases. Joint Bone Spine, 2012. 79(4): p. 351-5.
- 153. Molloy, E.S. and L.H. Calabrese, Progressive multifocal leukoencephalopathy: a national estimate of frequency in systemic lupus erythematosus and other rheumatic diseases. Arthritis Rheum, 2009. 60(12): p. 3761-5.

- 154. Gheuens, S., et al., Progressive multifocal leukoencephalopathy in individuals with minimal or occult immunosuppression. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2010. 81(3): p. 247-54.
- 155. Rosas, M.J., et al., Progressive multifocal leukoencephalopathy: unusual MRI findings and prolonged survival in a pregnant woman. Neurology, 1999. 52(3): p. 657-9.
- 156. Stockhammer, G., et al., Progressive multifocal leukoencephalopathy presenting with an isolated focal movement disorder. Mov Disord, 2000. 15(5): p. 1006-9.
- 157. Whiteman, M.L., et al., Progressive multifocal leukoencephalopathy in 47 HIV-seropositive patients: neuroimaging with clinical and pathologic correlation. Radiology, 1993. 187(1): p. 233-40.
- 158. Maas, R.P., et al., Drug-associated progressive multifocal leukoencephalopathy: a clinical, radiological, and cerebrospinal fluid analysis of 326 cases. J Neurol, 2016. 263(10): p. 2004-21.
- 159. Wuthrich, C. and I.J. Koralnik, Frequent infection of cortical neurons by JC virus in patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. J Neuropathol Exp Neurol, 2012. 71(1): p. 54-65.
- 160. Bartsch, T., et al., The spectrum of progressive multifocal leukoencephalopathy: a practical approach. Eur J Neurol, 2019. 26(4): p. 566-e41.
- 161. Lima, M.A., F.W. Drislane, and I.J. Koralnik, Seizures and their outcome in progressive multifocal leukoencephalopathy. Neurology, 2006. 66(2): p. 262-4.
- Bernal-Cano, F., J.T. Joseph, and I.J. Koralnik, Spinal cord lesions of progressive multifocal leukoencephalopathy in an acquired immunodeficiency syndrome patient. J Neurovirol, 2007. 13(5): p. 474-6.
- 163. Cinque, P., I.J. Koralnik, and D.B. Clifford, The evolving face of human immunodeficiency virus-related progressive multifocal leukoencephalopathy: defining a consensus terminology. J Neurovirol, 2003. 9 Suppl 1: p. 88-92.
- 164. Yousry, T.A., et al., Magnetic resonance imaging pattern in natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. Ann Neurol, 2012. 72(5): p. 779-87.
- 165. Fong, I.W., et al., Diagnostic value of detecting JC virus DNA in cerebrospinal fluid of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. J Clin Microbiol, 1995. 33(2): p. 484-6.
- 166. Kuhle, J., et al., Management and outcome of CSF-JC virus PCR-negative PML in a natalizumab-treated patient with MS. Neurology, 2011. 77(23): p. 2010-6.
- 167. Ikeda, J., et al., Brain Biopsy Is More Reliable than the DNA test for JC Virus in Cerebrospinal Fluid for the Diagnosis of Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. Intern Med, 2017. 56(10): p. 1231-1234.
- 168. 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.
- 169. Iacobaeus, E., et al., Analysis of cerebrospinal fluid and cerebrospinal fluid cells from patients with multiple sclerosis for detection of JC virus DNA. Mult Scler, 2009. 15(1): p. 28-35.
- 170. Clifford, D.B., Progressive multifocal leukoencephalopathy therapy. J Neurovirol, 2015. 21(6): p. 632-6.
- 171. Pavlovic, D., et al., Progressive multifocal leukoencephalopathy: current treatment options and future perspectives. Ther Adv Neurol Disord, 2015. 8(6): p. 255-73.
- 172. Maginnis, M.S., C.D. Nelson, and W.J. Atwood, JC polyomavirus attachment, entry, and trafficking: unlocking the keys to a fatal infection. J Neurovirol, 2015. 21(6): p. 601-13.
- 173. Gosert, R., et al., CMX001 (1-O-hexadecyloxypropyl-cidofovir) inhibits polyomavirus JC replication in human brain progenitor-derived astrocytes. Antimicrob Agents Chemother, 2011. 55(5): p. 2129-36.

- 174. Verma, S., et al., Mirtazapine in progressive multifocal leukoencephalopathy associated with polycythemia vera. J Infect Dis, 2007. 196(5): p. 709-11.
- 175. Przepiorka, D., et al., Successful treatment of progressive multifocal leukoencephalopathy with low-dose interleukin-2. Bone Marrow Transplant, 1997. 20(11): p. 983-7.
- 176. Kast, R.E., et al., Treatment schedules for 5-HT2A blocking in progressive multifocal leukoencephalopathy using risperidone or ziprasidone. Bone Marrow Transplant, 2007. 39(12): p. 811-2.
- 177. Darvin, P., et al., Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers. Exp Mol Med, 2018. 50(12): p. 1-11.
- 178. Barber, D.L., et al., Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. Nature, 2006. 439(7077): p. 682-7.
- 179. Tan, C.S., et al., Increased program cell death-1 expression on T lymphocytes of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. J Acquir Immune Defic Syndr, 2012. 60(3): p. 244-8.
- 180. Cortese, I., et al., Pembrolizumab Treatment for Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. N Engl J Med, 2019. 380(17): p. 1597-1605.
- 181. Rauer, S., et al., Treatment of Progressive Multifocal Leukoencephalopathy with Pembrolizumab. N Engl J Med, 2019. 380(17): p. 1676-1677.
- 182. Berger, J.R., PD-1 inhibition: a novel approach to the treatment of progressive multifocal leukoencephalopathy. Ann Transl Med, 2019. 7(Suppl 8): p. S281.
- 183. Beudel, M., et al., Single-Dose Pembrolizumab Treatment for Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm, 2021. 8(4).
- 184. Goereci, Y., et al., Clearance of JC polyomavirus from cerebrospinal fluid following treatment with interleukin-2 and pembrolizumab in an individual with progressive multifocal leukoencephalopathy and no underlying immune deficiency syndrome. Eur J Neurol, 2020. 27(11): p. 2375-2377.
- 185. Holmes, A., et al., Progressive multifocal leukoencephalopathy associated with a lymphoproliferative disorder treated with pembrolizumab. J Neurovirol, 2020. 26(6): p. 961-963.
- 186. Kapadia, R.K. and D. Ney, Stabilization of Progressive Multifocal Leukoencephalopathy After Pembrolizumab Treatment. Neurohospitalist, 2020. 10(3): p. 238-239.
- 187. Mahler, C., et al., Sequential interleukin 2 and pembrolizumab use in progressive multifocal leukoencephalopathy. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm, 2020. 7(4).
- 188. Roos-Weil, D., et al., Immune checkpoint inhibitors for progressive multifocal leukoencephalopathy: a new gold standard? J Neurol, 2021. 268(7): p. 2458-2465.
- 189. Walter, O., et al., Treatment of Progressive Multifocal Leukoencephalopathy with Nivolumab. N Engl J Med, 2019. 380(17): p. 1674-1676.
- 190. Hoang, E., et al., Progressive multifocal leukoencephalopathy treated with nivolumab. J Neurovirol, 2019. 25(2): p. 284-287.
- 191. Audemard-Verger, A., et al., Sustained Response and Rationale of Programmed Cell Death-1-Targeting for Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. Open Forum Infect Dis, 2019. 6(10): p. ofz374.
- 192. Uzunov, M., et al., Postallogeneic transplantation progressive multifocal leukoencephalopathy successfully treated by nivolumab. Br J Haematol, 2020. 188(6): p. e82-e84.
- 193. Pawlitzki, M., et al., Ineffective treatment of PML with pembrolizumab: Exhausted memory T-cell subsets as a clue? Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm, 2019. 6(6): p. e627.
- 194. Kupper, C., et al., Pembrolizumab for progressive multifocal leukoencephalopathy due to primary immunodeficiency. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm, 2019. 6(6): p. e628.

- 195. Medrano, C., et al., Effectiveness of Immune Checkpoint Inhibitors in Transplant Recipients with Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. Emerg Infect Dis, 2019. 25(11): p. 2145-2147.
- 196. Grassl, N., et al., Nivolumab for treatment of progressive multifocal leukoencephalopathy in Sezary syndrome. Eur J Neurol, 2020. 27(11): p. 2373-2374.
- 197. Stogbauer, J., et al., Clinical and magnetic resonance imaging monitoring in progressive multifocal leukoencephalopathy treated with pembrolizumab: a case report. Neurol Sci, 2021. 42(1): p. 357-359.
- 198. Patel, A., et al., Progressive Multifocal Leukoencephalopathy in a Patient With Progressive Multiple Sclerosis Treated With Ocrelizumab Monotherapy. JAMA Neurol, 2021. 78(6): p. 736-740.
- 199. Martinot, M., et al., Progressive Multifocal Leukoencephalopathy after Treatment with Nivolumab. Emerg Infect Dis, 2018. 24(8): p. 1594-1596.
- 200. Blankenbach, K., et al., Natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy in Germany. Neurology, 2019. 92(19): p. e2232-e2239.
- 201. Volk, T., et al., Pembrolizumab for treatment of progressive multifocal leukoencephalopathy in primary immunodeficiency and/or hematologic malignancy: a case series of five patients. J Neurol, 2021.
- 202. Mohn, N., et al., PD-1-inhibitor pembrolizumab for treatment of progressive multifocal leukoencephalopathy. Ther Adv Neurol Disord, 2021. 14: p. 1756286421993684.
- 203. Beck, E.S. and I. Cortese, Checkpoint inhibitors for the treatment of JC virus-related progressive multifocal leukoencephalopathy. Curr Opin Virol, 2020. 40: p. 19-27.
- 204. Lambert, N., M. El Moussaoui, and P. Maquet, Immune checkpoint inhibitors for progressive multifocal leukoencephalopathy: Identifying relevant outcome factors. Eur J Neurol, 2021.
- 205. Du Pasquier, R.A., Pembrolizumab as a treatment for PML? Waiting for Godot. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm, 2019. 6(6): p. e629.
- 206. Bernard-Valnet, R., I.J. Koralnik, and R. Du Pasquier, Advances in Treatment of Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. Ann Neurol, 2021.
- 207. White, M.K., et al., Animal Models for Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. J Cell Physiol, 2015. 230(12): p. 2869-74.
- 208. Frost, E.L. and A.E. Lukacher, The importance of mouse models to define immunovirologic determinants of progressive multifocal leukoencephalopathy. Front Immunol, 2014. 5: p. 646.
- 209. Tan, C.S., et al., Detection of JC virus-specific immune responses in a novel humanized mouse model. PLoS One, 2013. 8(5): p. e64313.
- 210. Kondo, Y., et al., Human glial chimeric mice reveal astrocytic dependence of JC virus infection. J Clin Invest, 2014. 124(12): p. 5323-36.
- 211. Ayers, K.N., S.N. Carey, and A.E. Lukacher, Understanding polyomavirus CNS disease a perspective from mouse models. FEBS J, 2021.
- 212. Lima, M.A., et al., Clinical outcome of long-term survivors of progressive multifocal leukoencephalopathy. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2010. 81(11): p. 1288-91.
- 213. Miskin, D.P., et al., Predictors and characteristics of seizures in survivors of progressive multifocal leukoencephalopathy. J Neurovirol, 2016. 22(4): p. 464-71.
- 214. Ryschkewitsch, C.F., et al., JC virus persistence following progressive multifocal leukoencephalopathy in multiple sclerosis patients treated with natalizumab. Ann Neurol, 2010. 68(3): p. 384-91.
- 215. Himedan, M., et al., Pathologic Findings of Chronic PML-IRIS in a Patient with Prolonged PML Survival Following Natalizumab Treatment. J Investig Med High Impact Case Rep, 2017. 5(3): p. 2324709617734248.
- 216. Crossley, K.M., et al., Recurrence of progressive multifocal leukoencephalopathy despite immune recovery in two HIV seropositive individuals. J Neurovirol, 2016. 22(4): p. 541-5.

- 217. Maillart, E., et al., Natalizumab-PML survivors with subsequent MS treatment: Clinicoradiologic outcome. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm, 2017. 4(3): p. e346.
- 218. Loeber, G. and K. Dorries, DNA rearrangements in organ-specific variants of polyomavirus JC strain GS. J Virol, 1988. 62(5): p. 1730-5.
- 219. Frisque, R.J., Nucleotide sequence of the region encompassing the JC virus origin of DNA replication. J Virol, 1983. 46(1): p. 170-6.
- 220. Daniel, A.M. and R.J. Frisque, Transcription initiation sites of prototype and variant JC virus early and late messenger RNAs. Virology, 1993. 194(1): p. 97-109.
- 221. Martin, J.D., et al., Differences in regulatory sequences of naturally occurring JC virus variants. J Virol, 1985. 53(1): p. 306-11.
- 222. Iida, T., et al., Origin of JC polyomavirus variants associated with progressive multifocal leukoencephalopathy. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(11): p. 5062-5.
- 223. Flaegstad, T., et al., Amplification and sequencing of the control regions of BK and JC virus from human urine by polymerase chain reaction. Virology, 1991. 180(2): p. 553-60.
- 224. Reid, C.E., et al., Sequencing and analysis of JC virus DNA from natalizumab-treated PML patients. J Infect Dis, 2011. 204(2): p. 237-44.
- 225. Zheng, H.Y., et al., Stability of JC virus coding sequences in a case of progressive multifocal leukoencephalopathy in which the viral control region was rearranged markedly. Arch Pathol Lab Med, 2004. 128(3): p. 275-8.
- 226. Ault, G.S., Activity of JC virus archetype and PML-type regulatory regions in glial cells. J Gen Virol, 1997. 78 (Pt 1): p. 163-9.
- 227. Sabath, B.F. and E.O. Major, Traffic of JC virus from sites of initial infection to the brain: the path to progressive multifocal leukoencephalopathy. J Infect Dis, 2002. 186 Suppl 2: p. S180-6.
- 228. Daniel, A.M., et al., Sequences within the early and late promoters of archetype JC virus restrict viral DNA replication and infectivity. Virology, 1996. 216(1): p. 90-101.
- 229. Vaz, B., et al., Analysis of the transcriptional control region in progressive multifocal leukoencephalopathy. J Neurovirol, 2000. 6(5): p. 398-409.
- 230. Marshall, L.J., L. Dunham, and E.O. Major, Transcription factor Spi-B binds unique sequences present in the tandem repeat promoter/enhancer of JC virus and supports viral activity. J Gen Virol, 2010. 91(Pt 12): p. 3042-52.
- Marshall, L.J., et al., JC virus promoter/enhancers contain TATA box-associated Spi-B-binding sites that support early viral gene expression in primary astrocytes. J Gen Virol, 2012. 93(Pt 3): p. 651-661.
- 232. Jensen, P.N. and E.O. Major, A classification scheme for human polyomavirus JCV variants based on the nucleotide sequence of the noncoding regulatory region. J Neurovirol, 2001. 7(4): p. 280-7.
- 233. Zheng, H.Y., et al., New sequence polymorphisms in the outer loops of the JC polyomavirus major capsid protein (VP1) possibly associated with progressive multifocal leukoencephalopathy. J Gen Virol, 2005. 86(Pt 7): p. 2035-2045.
- 234. Delbue, S., et al., JC virus VP1 loop-specific polymorphisms are associated with favorable prognosis for progressive multifocal leukoencephalopathy. J Neurovirol, 2009. 15(1): p. 51-6.
- 235. Sunyaev, S.R., et al., Adaptive mutations in the JC virus protein capsid are associated with progressive multifocal leukoencephalopathy (PML). PLoS Genet, 2009. 5(2): p. e1000368.
- 236. Gorelik, L., et al., Progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) development is associated with mutations in JC virus capsid protein VP1 that change its receptor specificity. J Infect Dis, 2011. 204(1): p. 103-14.
- 237. Freund, R., et al., A single-amino-acid substitution in polyomavirus VP1 correlates with plaque size and hemagglutination behavior. J Virol, 1991. 65(1): p. 350-5.

- 238. Korth, J., et al., Measurement of BK-polyomavirus Non-Coding Control Region Driven Transcriptional Activity Via Flow Cytometry. J Vis Exp, 2019(149).
- 239. Korth, J., et al., Impact of immune suppressive agents on the BK-Polyomavirus non coding control region. Antiviral Res, 2018. 159: p. 68-76.
- 240. L'Honneur, A.S., et al., Exploring the role of NCCR variation on JC polyomavirus expression from dual reporter minicircles. PLoS One, 2018. 13(6): p. e0199171.
- 241. Johnson, E.M., et al., Polyomavirus JC in the context of immunosuppression: a series of adaptive, DNA replication-driven recombination events in the development of progressive multifocal leukoencephalopathy. Clin Dev Immunol, 2013. 2013: p. 197807.
- 242. Chi, X., Y. Li, and X. Qiu, V(D)J recombination, somatic hypermutation and class switch recombination of immunoglobulins: mechanism and regulation. Immunology, 2020. 160(3): p. 233-247.
- 243. Lauver, M.D. and A.E. Lukacher, JCPyV VP1 Mutations in Progressive MultifocalLeukoencephalopathy: Altering Tropismor Mediating Immune Evasion? Viruses, 2020. 12(10).
- 244. Lauver, M.D., et al., Antibody escape by polyomavirus capsid mutation facilitates neurovirulence. Elife, 2020. 9.
- 245. Chalkias, S., et al., ViroFind: A novel target-enrichment deep-sequencing platform reveals a complex JC virus population in the brain of PML patients. PLoS One, 2018. 13(1): p. e0186945.
- 246. Takahashi, K., et al., Deep-Sequence Identification and Role in Virus Replication of a JC Virus Quasispecies in Patients with Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. J Virol, 2017. 91(1).
- 247. Wilczek, M.P., et al., Rearrangement in the Hypervariable Region of JC Polyomavirus Genomes Isolated from Patient Samples and Impact on Transcription Factor-Binding Sites and Disease Outcomes. Int J Mol Sci, 2022. 23(10).

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den lieben Menschen bedanken, die mich während der Durchführung der Experimente, der Auswertung der Daten und des Schreibprozesses begleitet und unterstützt haben – die nie aufgehört haben, an mein Ziel und mich zu glauben und mir stets physisch und mental zur Seite standen.

Explizit betonen möchte ich meine wundervollen Eltern und meine Schwester Julia, die mich mit dem Selbstvertrauen, der Kraft und den Fähigkeiten ausgestattet haben, die während dieser Promotion unerlässlich waren. Ohne diese Familie wäre ich heute nicht da, wo ich jetzt stehe.

Gleichzeitig gilt mein Dank meinem Doktorvater Prof. Ortwin Adams, der mich mit diesem spannenden Thema begeistern konnte und insbesondere in der Phase der Experimente stets gute Ratschläge gegeben hat.

Ich möchte mich auch bei meinem Partner Max bedanken, der mich durch sein naturwissenschaftliches Verständnis dazu ermutigt hat, die Daten auch nochmal aus einer anderen Perspektive zu betrachten.

Als letztes möchte ich mich bei all meinen Freunden bedanken, die mir stets Mut zugesprochen und mich in Phasen des Schreibprozesses mit entsprechender Nervennahrung versorgt haben.

Vielen Dank für alles!