Christian und meinen Eltern Aus der Neurologischen Klinik des Marienkrankenhauses Hamburg Lehrkrankenhaus der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg Chefarzt: Prof. Dr. med. Thomas Weber

Entwicklung eines ELISA zum serologischen Nachweis von Immunglobulin M gegen JC-Virus

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Astrid Kappuhne

aus Northeim

Hamburg 2003

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Universität Hamburg am: 18. Juli 2003

Veröffentlichung mit Genehmigung des Fachbereiches Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuß, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Th. Weber

Prüfungsausschuß: 2. Gutachter/in: Priv. Doz. Dr. H. J. Stürenburg

Prüfungsausschuß: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. H. H. Feucht

Inhaltsverzeichnis

INF	INHALTSVERZEICHNISI									
1	EINLEITUNG1									
1	.1	Das	Krankheitsbild der progressiven multifokalen							
		Leu	koenzephalopathie1							
	1.1	.1	Symptome4							
	1.1	.2	Diagnose4							
	1.1	.3	Prognose7							
	1.1	.4	Therapie8							
1	1.2 Serologische Diagnose der JCV-Infektion8									
1	1.3 Ziel der Arbeit9									
2	MA	TER	ALIEN UND METHODEN10							
2	2.1	ELI	SA (Enzyme Linked Immunosorbant Assay)10							
	2.1	.1	Expression des rekombinanten Virusproteins 1 (VP1) in Sf							
			(Spodoptera frugiperda) 158 - Zellen für den Einsatz im							
			ELISA10							
	2.1	.2	ELISA-Platten							
	2.1	.3	ELISA zum Nachweis von IgG - Antikörpern gegen VP1 -							
	VLP									
2	2.2	Dire	ekte ELISA-Verfahren zum Nachweis von VP1-VLP-							
		spe	zifischem IgM12							
	2.2	.1	Direkter ELISA mit einem polyklonalen Peroxidase-							
			konjugierten Detektionsantikörper							
	2.2	.2	Direkter ELISA mit einem Alkalische-Phosphatase-							
konjugierten Detektionsantikörper										
2	2.3 Capture-Assays zum Nachweis von VP1-VLP-spezifischem									
	IaM									
	2.3	.1	Gewinnung von VP1-VLP-spezifischem laG des Kaninchens							
	für den Einsatz im IgM-capture-ELISA									

2.3.1.1			1	Affinitätschromatographische Reinigung von IgG aus						aus			
dem Hyperimmunserum									15				
	2.3.1.		2	Direkter ELISA		zum	Nacl	nweis	von	lgG	in	den	
				Fraktio	onen	۱							15
	2.3.2	2	Сар	apture-ELISA			mit		einem		pol	yklor	alen
			Bes	eschichtungsantikörp			rper						16
	2.3.3	3	Сар	ture-E	LISA	\	mit	e	einem		mon	oklor	alen
			Bes	chichtu	ingsa	antikö	rper						18
2.4	4	Indi	irekte	er EL	ISA	mit	einem	Dete	ktions	ssyste	em a	us	zwei
		Ant	ikörp	oern z	um	Nach	weis v	on VF	P1 – \	/LP -	spez	ifisc	hem
		lgM											19
2.	5	Ana	alyse	von l	Patie	entens	seren a	uf Igl	M-Anti	ikörpe	er ge	gen '	VP1-
		VLF	i m	indire	ekter	n ELIS	SA mit	einer	n Det	ektio	nssys	stem	aus
		zwe	ei Ant	tikörp	ern .								20
	2.5.	1	Pati	entens	eren	1							20
	2.5.2	2	Refe	erenzk	urve								21
	2.5.3 Ve			rsuchsablauf21									
2	2.5.4 Be		Best	stimmung der unteren Nachweisgrenze							21		
2.5.5 Aus			wertun	g								22	
2.	6	Ana	alyse	der	pos	itiven	Patie	ntens	eren	auf l	gG-A	ntikö	rper
		geg	en V	P1-VL	P								22
2.	7	Pol	yacry	/lamid	-Gel	lelektı	rophor	ese ur	nd We	stern	Blot.		23
	2.7.	1	Giel	sen de	r Ge	le							23
2	2.7.2 A		Auft	Auftragen der Proteingemische und Elektrophorese2								23	
	2.7.3 W		Wes	/estern-Blot							24		
4	2.7.4	4	Nac	hweis	von '	VP1-V	/LP-spe	zifisch	nem Ig	Μ			24
3	ERG	GEB	NISS	E									26
2													
5.	1	ELI	5A-P	atten	ausv	wani		•••••		•••••		•••••	26
3.2	3.2 Direkte				A-Ve	erfahr	en zu	m Na	achwe	eis v	on \	/P1-\	/LP-
spezifischem IgM								27					

3.2.1	Direkter ELISA mit einem polyklonalen Peroxidase-							
	konjugierten Detektionsantikörper27							
3.2.2	Direkter ELISA mit einem monoklonalen alkalische							
	Phosphatase-konjugierten Detektionsantikörper27							
3.3 Ca	pture-ELISA-Verfahren zum Nachweis von VP1-VLP-							
sp	ezifischem IgM28							
3.3.1	IgM-capture-ELISA mit einem polyklonalen							
	Beschichtungsantikörper28							
3.3.2	Capture-ELISA mit einem monoklonalen							
	Beschichtungsantikörper29							
3.4 Inc	direkter ELISA mit einem Detektionssystem aus zwei							
Ar	ntikörpern29							
3.5 Me	essergebnisse im indirekten ELISA mit einem							
De	etektionssystem aus zwei Antikörpern							
3.5.1	5.1 Referenzserum							
3.5.2	Ergebnisse der Patientenmessungen							
3.6 Te	st der positiven Patientenseren auf IgG-Antikörper gegen							
VF	P1-VLP							
3.7 Pc	olyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot							
4 DISKU	55IUN							
4.1 De	er ELISA als Nachweismethode für VP1-VLP-spezifische							
Ar	ntikörper35							
4.2 Pr	Probleme beim serologischen Nachweis von IgM							
4.3 Di	Die verschiedenen ELISA-Verfahren zum Nachweis von VP1-							
VL	VLP-spezifischem IgM38							
4.4 De	Der indirekte ELISA mit einem Detektionssystem aus zwei							
Ar	Antikörpern zum Nachweis von laM-Antikörpern degen VP1-							
VL	P							
4.4.1	Bedeutung von Positiv- und Negativkontrolle sowie							
	Aussagekraft der Referenzkurve42							
4.4.2	Die untere Nachweisgrenze43							

	4.4.	3 Inte	erpretation de	r Messerg	ebnisse	46			
4	4.5	Polyacr	ylamid-Gele	lektropho	rese und Wester	rn-Blot48			
4	4.6	Ausblic	k auf	das	Screening	ausgewählter			
		Patiente	enkollektive			49			
5	ZUS	SAMMEN	IFASSUNG.			50			
6	AN	HANG				51			
	6.1	Abkürz	ungsverzeic	hnis		51			
	6.2	Abbildungsverzeichnis54							
	6.3	Tabellenverzeichnis55							
	6.4	Puffer				56			
	6.4.	1 ELI	SA			56			
	6.4.	2 We	stern Blot			57			
	6.5	Human	es Referenz	serum für	die Auswahl dei	^r Platten58			
	6.6	Humanes Referenzserum für den IgM-ELISA59							
	6.7	Patientenliste des IgM-Screenings60							
	6.8	Literatu	irverzeichnis	S		62			

1 Einleitung

1.1 Das Krankheitsbild der progressiven multifokalen Leukoenzephalopathie

Die progressive multifokale Leukoenzephalopathie (PML) ist die einzige bekannte demyelisierende Erkrankung des menschlichen Gehirns, der eine lytische Virusinfektion der Myelin produzierenden Oligodendrozyten zugrunde liegt. Als ätiologisches Agens wurde das menschliche Polyomavirus JC-Virus (JCV) nachgewiesen.

Im Jahre 1930 beschrieb der Pathologe J. HALLERVORDEN erstmals in seiner Veröffentlichung "Eigenartige und nicht rubrizierbare Prozesse" neuropathologische Befunde bei dementen Patienten, die er in keine der bisher bekannten Krankheitsgruppen einordnen konnte (HALLERVORDEN, 1930).

Der Terminus PML wurde 1958 von ÅSTRÖM und seinen Mitarbeitern eingeführt, die einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten multifokaler Entmarkungsherde im Gehirn und konsumierenden Erkrankungen wie einer chronisch lymphatischen Leukämie und einem Morbus Hodgkin feststellten (ÅSTRÖM, et al. 1958). In diesen Autopsiebefunden wurden Bezirke kleiner, zum Teil konfluierender Plaques in der weißen Hirnsubstanz beschrieben, die sich in den Hemisphären, Basalganglien, Thalamus, Kleinhirn und Hirnstamm fanden.

Bereits 1959 wurde von CAVANAGH und Mitarbeitern eine Virusinfektion infolge einer Immunschwäche als mögliche Ursache der PML postuliert, nachdem sie Einschlußkörper in den Kernen zerstörter Oligodendrozyten nachgewiesen hatten (CAVANAGH et al., 1959).

1965 konnten papovavirusähnliche Partikel in den Kernen zerstörter Oligodendrozyten elektronenmikroskopisch dargestellt werden (SILVERMAN und RUBINSTEIN, 1965; ZU RHEIN und CHOU, 1965).

PADGETT und ihren Mitarbeitern gelang es 1971, ein Papovavirus aus dem Gehirn eines PML-Patienten durch Inokulation einer Zellreihe humaner fötaler Gliazellen (<u>primary human fetal glia cells</u>, PHFG) zu isolieren und zu

züchten (PADGETT et al., 1971). Das Virus wurde nach den Initialen dieses Patienten (John Cunningham) JC-Virus genannt und als Polyomavirus hominis 2 neben dem BK-Virus (Polyomavirus hominis 1) und dem Affenvirus 40 (<u>s</u>imian <u>v</u>irus 40, SV 40, Polyomavirus macacae) in die Familie der Polyomaviren eingeordnet (SHAH, 1996).

Vor der Ära des erworbenen Immundeffizienzsyndroms (<u>a</u>quired immunodeficiency syndrome, AIDS) trat die PML überwiegend bei lymphoproliferativen Erkrankungen wie einem Morbus Hodgkin oder einem Non-Hodgkin-Lymphom auf. In einigen Fällen wurde die PML unter therapeutischer Immunsuppression, wie z.B. nach Nierentransplantation, beobachtet und nur selten lag eine konsumierende Erkrankung, wie etwa eine Sarkoidose oder Tuberkulose, vor (BROOKS und WALKER, 1984). In einem Fall einer 75-jährigen Frau lag keine bekannte prädisponierende Erkrankung zugrunde (ALAFUZOFF, 1999). Eine PML im Zusammenhang mit AIDS wurde erstmalig 1982 beschrieben (MILLER et al., 1982). Heute liegt in 55 - 85 % der PML-Fälle das Vollbild der AIDS-Erkrankung vor (HOLMAN et al., 1991; BERGER, 2000). Im Gegensatz zu anderen opportunistischen Infektionen des Gehirns wie der Kryptokokkenmeningitis oder dem primären Lymphom des zentralen Nervensystems, hat die Häufigkeit der PML bei HIV-Infizierten nicht abgenommen (ANTINORI et al., 2001; SACKTOR et al., 2001). Auch einige wenige Fälle einer Erstmanifestation der Infektion mit dem menschlichen Immundefizienzvirus (Human Immunodeficiency Virus, HIV) durch die PML sind beschrieben worden (DUPUIS et al., 1986; BERGER et al., 1987 b). Die PML zählt zu den charakteristischen opportunistischen Infektionen bei AIDS und definiert das Stadium C der Klassifikation des Centers for Disease Control (CDC) (CDC-Klassifikation, 1993). Die Inzidenz der PML bei AIDS-Kranken liegt zwischen 0,72 % (HOLMAN et al., 1991), 2 % (BACELLAR et al., 1994), 4 % (BERGER et al., 1987 a), 4-5 % (HAPPE et al., 1999), bis zu 5 % (BERGER und MAJOR, 1999), 5 % (WASMUTH et al.; 1999) und 7 % (LANG et al., 1989).

Da das Erkrankungsalter bei der PML vor allem von der Grunderkrankung bestimmt wird, trat sie bis 1984 hauptsächlich in der sechsten Lebensdekade auf. Heute findet man die höchste Inzidenz bei Personen im Alter von 20 bis 50 Jahren (STONER et al. 1988 b; HOLMAN et al., 1991). Vereinzelt wird auch von einer PML bei Kindern mit HIV-Infektion oder angeborener Immundefizienz berichtet (BERGER et al., 1992 a; KATZ et al., 1994; ZU RHEIN et al., 1978).

Seroepidemiologischen Untersuchungen zufolge sind bereits Kinder im Alter von bis zu fünf Jahren zu 45 % seropositiv für JCV. Mit zehn Jahren sind es 65 %, und bei der erwachsenen Bevölkerung findet man bei mehr als 80 % (HOU und MAJOR, 2000) bzw. bis zu 85 % (PADGETT und WALKER, 1973; TAGUCHI et al., 1982) Antikörper gegen JCV. Klinische Symptome der ersten Infektion mit JCV sind nicht bekannt (PADGETT und WALKER, 1973). Da es bei PML-Patienten nicht zu einem Anstieg des Antikörpertiters während der Erkrankung kommt und mit den derzeitigen Methoden keine IgM-Antikörper gegen JCV im Serum von PML-Patienten nachweisbar sind, geht man davon aus, dass eine Reaktivierung einer latenten Infektion im Rahmen einer Immunsuppression zu einer lytischen Infektion der Oligodendrozyten mit JCV führt und damit zum Bild einer PML (PADGETT und WALKER, 1983; BROOKS und WALKER, 1984).

Diese lytische Infektion der Oligodendrozyten führt bei PML-Patienten zu zahlreichen Entmarkungsherden, deren Größe zwischen etwa einem Millimeter und mehreren Zentimetern variiert. Kleinere Herde liegen dabei bevorzugt an der kortikomedullären Grenze (BERGER und CONCHA, 1995). Diese Läsionen können an Größe zunehmen, konfluieren und sich damit großflächig in die weiße und zum Teil auch in die graue Hirnsubstanz ausbreiten (LEDOUX et al., 1989; VON EINSIEDEL et al., 1993; KUCHELMEISTER et al., 1993). Dabei ist überwiegend die weiße Substanz der Hemishpären (bevorzugt parieto-okzipital) betroffen. Die Läsionen werden aber auch im Kleinhirn, im Hirnstamm (RICHARDSON, 1961) und selten im Rückenmark (BAUER et al., 1969; KUCHELMEISTER et al., 1993) gefunden.

1.1.1 Symptome

Durch die unterschiedliche Lokalisation und die variable Beteiligung der weißen Hirnsubstanz kann das klinische Bild von einer Vielzahl von neurologischen Symptomen geprägt sein. Klinischen Untersuchungen von BROOKS und WALKER (1984), BERGER et al. (1987 a) und VON EINSIEDEL et al. (1993) zufolge dominieren in jeweils einem Drittel der Fälle visuelle Beeinträchtigungen, Lähmungen und kognitive Störungen das klinische Bild. Neuroophthalmologische Ausfälle sind bei 30-45 % der Fälle Erstsymptome (BROOKS und WALKER, 1984) und werden im Verlauf der Erkrankung bei bis zu 50 % gefunden. Hier findet sich am häufigsten eine homonyme Hemianopsie. Bei 5-8 % ist zum Zeitpunkt der Diagnose bereits eine kortikale Blindheit vorhanden (BROOKS und WALKER, 1984). Die motorische Schwäche zeigt sich meist als eine Hemiparese, kann sich aber auch als Monoparese, Hemiplegie oder Tetraparese manifestieren (BERGER und CONCHA, 1995). Ungefähr ein Fünftel der Patienten zeigt zum Zeitpunkt der Diagnose cerebelläre Symptome (BROOKS und WALKER, 1984). Das vielfältige Spektrum der kognitiven Störungen beinhaltet Verhaltensstörungen und Persönlichkeitsveränderungen, Konzentrationsschwäche sowie Gedächtnis- und Sprachstörungen (BROOKS und WALKER, 1984; BERGER, 2000). Bei 25 % der Patienten ist zum Zeitpunkt der Diagnose eine Demenz vorhanden (BROOKS und WALKER, 1984). Weitere Symptome einer PML können Sensibilitätsausfälle, Kopfschmerzen, Schwindel und epileptische Anfälle sein (BERGER und CONCHA, 1995).

1.1.2 Diagnose

Nach wie vor läßt sich die Diagnose einer PML mit der höchsten Zuverlässigkeit durch eine Hirnbiopsie stellen (AMMASSARI et al., 2000; GILDENBERG et al., 2000). Mit großer Sicherheit kann die Diagnosestellung typischen histopathologischen Merkmale, anhand der wie fokaler Entmarkung, Untergang von Oligodendrozyten und vergrößerten, teilweise bizzar verformten Astrozyten, erfolgen (CHAPPELL et al., 1992; FEIDEN et 1993). al., Mittels In-Situ-Hybridisierung und In-Situ-Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) kann JCV-spezifische

DNA in bioptischem Material nachgewiesen werden (AKSAMIT et al., 1987; TELENTI et al., 1990; UEKI et al., 1994; SAMOREI et al. 2000). Immunzytochemisch lassen sich sowohl das große T-Antigen als auch die viralen Kapsidproteine in infizierten Zellen darstellen (GERBER et al., 1980; GREENLEE und KEENEY, 1986; STONER et al., 1986; AKSAMIT et al., 1990; WEBER et al., 1994 a). Mit der VP1-Immunhistochemie steht ebenfalls ein spezifisches und sensitives Nachweisverfahren zur Bestätigung der Diagnose einer PML zur Verfügung (JOCHUM et al., 1997). In den letzten Jahren hat die Liquordiagnostik bei der PML zunehmend an Bedeutung gewonnen (WEBER, 1999). Mit hoher Sensitivität und noch höherer Spezifität konnten verschiedene Arbeitsgruppen mittels PCR JCV-spezifische DNA im Liquor von Patienten mit PML nachweisen. Die Sensitivität betrug zwischen 76 % (GIBSON et al., 1993), 82 % (WEBER et al., 1994 a; WEBER et al., 1994 b), 92 % (MCGUIRE et al., 1995) und 100 % (MORET et al., 1993), die Spezifität lag in drei Studien bei 100 % (GIBSON et al., 1993; MORET et al., 1993; WEBER et al., 1994 a; WEBER et al., 1994 b) und in einer Studie bei 92 % (MCGUIRE et al., 1995).

Mittels eines Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) kann eine intrathekale Antikörpersynthese gegen das JCV-Kapsidprotein Virusprotein 1 (VP1) bei Patienten mit PML nachgewiesen werden. Eine Diagnosestellung ist hierbei durch die Bildung eines VP1-IgG-ASI (Antikörperspezifitätsindex) möglich (REIBER und LANGE, 1991). Die Sensitivität dieses Tests liegt bei 76 bis 80%, die Spezifität bei 98 bis 99 % (TREBST, 1995; WEBER et al., 1997). Da die Durchseuchung der erwachsenen Bevölkerung mit JCV sehr hoch ist, ist der Antikörpernachweis gegen JCV allein im Serum diagnostisch ohne große Relevanz (PADGETT und WALKER, 1983; TREBST, 1995). Untersuchungen des Liquor cerebrospinalis bezüglich Veränderungen der Zellzahl und Zellmorphologie sowie des Proteingehaltes ergeben ebenfalls keine spezifischen diagnostischen Hinweise auf eine PML (BROOKS und WALKER, 1984).

Bildgebende Verfahren bieten die besten nicht-invasiven Möglichkeiten zur Diagnose einer PML. Im Computertomogramm des Gehirns stellen sich diffuse hypodense Areale in der weißen Hirnsubstanz (bevorzugt parietookzipital) ohne Ödem oder Raumforderung dar, die die Rinden-Mark-Grenze nicht überschreiten, den Gefäßaufzweigungen nicht folgen und kein Kontrastmittel anreichern (BOSCH et al., 1976; CONOMY et al., 1976; KRUPP et al., 1985). Die selten beschriebene Kontrastmittelanreicherung in den Randbezirken der Herde kann als Dilatation der kleinen Arterien und Venen, die um die Läsion gelegen sind, interpretiert werden (KRUPP et al., 1985; SCULLY et al., 1988). Eine Verdrängung umliegender Strukturen zeigen die Entmarkungsherde nur in Ausnahmefällen (PRESKORN und WATANABE, 1979). Ein noch weit sensitiveres Verfahren stellt die Kernspintomographie (Magnetic Resonance Imaging, MRI) dar (GUILLEUX et al., 1986; LEVY et al., 1986; NEWTON et al., 1995; ANTINORI et al., 1997; WHITEMAN et al., 1993; VON GIESEN et al., 1997). Die PML zeigt eine asymmetrische, fleckförmige Verteilung in der weißen Substanz. Typisch sind in der T1-Wichtung homogene, hypointense Herde, die den Kortex auszusparen scheinen und in der T2-Wichtung in gleicher Ausdehnung als hyperintense Herde erscheinen. Es können sich einzelne oder multiple Läsionen zeigen, oft ist auch das Kleinhirn und der Hirnstamm betroffen. Bevorzugt werden die parietookzipitalen Areale befallen. (WHITEMAN et al., 1993). In seltenen Fällen reichern die Läsionen Gadolinium an (CIRICILLO und ROSENBLUM, 1990; WHITEMAN et al., 1993). Vermutlich aufgrund der höheren Empfindlichkeit der Kernspintomographie finden sich nach Ansicht einiger Autoren in 25 bis 50 % aller PML-Fälle auch Läsionen der grauen Substanz (VON EINSIEDEL et al., 1993; ANTINORI et al., 1997; KASNER et al., 1997). Im Verlauf der Erkrankung lässt sich eine Größenzunahme der einzelnen Herde und das Auftreten neuer Entmarkungsherde nachweisen (BERGER et al., 1987; VON GIESEN et al., 1997). Die Magnetresonanz-Spektroskopie liefert Informationen über biochemische Veränderungen von Hirngewebe in vivo. Für Läsionen, die durch PML verursacht sind, ist ein homogenes Muster mit deutlich erhöhtem N-Acetylaspartat, Anwesenheit von Lactat und deutlich erhöhten Cholin und Lipidwerten charakteristisch. Dies entspricht dem Neuronenverlust, der Zerstörung von Zellmmembranen und Myelin, sowie der erhöhten gliösen Aktivität in PML-Läsionen (DE STEFANO et al., 1997; CHANG et al., 1997; LAUBENBERGER et al., 1998; IRANZO et al., 1999). Die Spezifität in der Differentialdiagnose von HIV-assoziierten Läsionen des Gehirns ist jedoch gering (SIMONE et al., 1998). Diskutiert werden auch die ⁹⁹Tc^m-Hexamethylpropylenaminoxim (HMPAO)-<u>S</u>ingle-<u>Photon-E</u>missionstomographie (SPECT) (BOWLER et al., 1992) und die Ableitung von akustisch und visuell evozierten Potentialen (LIPTON et al., 1988). Kontrollierte Studien zum Stellenwert dieser Verfahren in der Diagnostik der PML liegen bis heute nicht vor.

1.1.3 Prognose

Die PML nimmt unabhängig von der bestehenden Grunderkrankung einen progredienten Verlauf und hatte bis vor wenigen Jahren eine mittlere Überlebenszeit von vier bis sechs Monaten nach Diagnosestellung (BROOKS und WALKER, 1984; BERGER et al., 1987 a; VON EINSIEDEL et al., 1993; HALL et al., 1998). Innerhalb des ersten Jahres nach Diagnosestellung versterben über 90 % der Patienten. Bei der HIVassoziierten PML scheint sich die Überlebenszeit nach Auftreten der ersten neurologischen Symptome nicht von der bei anderen immunsuppressiven Umständen zu unterscheiden (BERGER et al., 1987; BROOKS und WALKER, 1984). Einige Fälle längerer Überlebenszeiten sowohl von HIV positiven als auch von HIV negativen Patienten von bis zu acht Jahren sind beschrieben worden (HEDLEY-WHITE et al., 1966; PRICE et al., 1983; BERGER und MUCKE, 1988; TORNATORE et al., 1991; LORTHOLARY et al., 1994; BERGER und CONCHA, 1995; BERGER et al., 1998). Seit Einführung der hochaktiven antiretroviralen Therapie (highly active antiretroviral therapy, HAART) weisen zahlreiche Berichte auf eine deutliche Verlängerung der mittleren Überlebenszeit auf mehr als ein Jahr hin (ALBRECHT et al., 1998; ANTINORI et al., 2001; CLIFFORD et al., 1999; DE LUCA et al., 2001; GESCHWIND et al., 2001; GIUDICI et al., 2000; MIRALLES et al., 1998; ZIMMERMANN et al., 2001). Die Überlebenszeit hängt von Faktoren wie der Viruslast in der Cerebrospinalflüssigkeit und der CD4-Zell-Zahl im Blut ab. Der JC-Virus-DNA-Gehalt im Liquor ist hierbei von prognostischer Bedeutung und auch ein Verlaufsparameter für die PML (GASNAULT et al. 2001; DE LUCA et al., 2001). Ein niedriger DNA-Gehalt spricht für eine längere Überlebenszeit (<50 bis 100 Kopien/µl) (YIANNOUTSOS et al., 1999).

1.1.4 Therapie

Eine Vielzahl von Medikamenten und Behandlungsschemata wurde für die Therapie der PML vorgeschlagen, aber bis jetzt gibt es keine Wirkstoffe, deren klinische Wirksamkeit gegen JCV erwiesen ist.

Einige Therapieansätze, wie die hochaktive antiretrovirale Therapie (HAART) (GIUDICI et al., 2000; INUI et al., 1999), die kombinierte antiretrovirale Therapie (<u>c</u>ombined <u>a</u>ntiretroviral <u>t</u>herapy, CART) (GASNAULT et al., 1999) oder die Gabe von Cidofovir (HAPPE et al., 1999), scheinen allerdings in Verbindung mit einer Verlängerung der Überlebenszeit zu stehen.

Es gab Hinweise auf eine Wirksamkeit von Cytosinarabinosid (ARA-C) in verschiedenen Fallstudien (VAN HORN et al., 1978; SMITH et al., 1982; GREENLEE, 1998), diese wurde jedoch in einer kontrollierten klinischen Studie widerlegt (HALL et al., 1998). Ebensowenig ließ sich die Wirksamkeit von α -Interferon belegen (BERGER et al., 1992; GESCHWIND et al., 2001; HEIDE et al., 1995). Über die Behandlung mit anderen Nukleosidanaloga oder Enzyminhibitoren wie Topotecan und Campothecin gibt es nur Fallberichte (VOLLMER-HAASE et al., 1997).

Bei PML-Patienten mit AIDS zeigt sich unter hochaktiver antiretroviraler Therapie (HAART) mit mindestens drei verschiedenen antiretroviralen Medikamenten eine verlängerte Überlebenszeit und teilweise Remissionen der neurologischen Symptome (ALBRECHT et al., 1998; ARRIBAS et al., 1998; CLIFFORD et al., 1999; DOMINGO et al., 1997; MIRALLES et al., 1998). Hierbei besteht allerdings eine deutliche Korrelation mit der Virus-Last (HIV) und einem Anstieg des CD4-cell-count und somit einer Verbesserung der allgemeinen Immunitätslage (GASNAULT et al. 2001; DE LUCA et al., 2001).

1.2 Serologische Diagnose der JCV-Infektion

Es existiert ein ELISA zum serologischen Nachweis von VP1-spezifischen Antikörpern vom Typ des IgG (WEBER et al., 1997). Es handelt sich bei VP1

um das Hauptstrukturprotein des JC-Virus. VP1 bildet spontan virus-ähnliche Partikel (VP1-VLP), die als Antigen eingesetzt werden (GOLDMANN et al., 1999). Durch Messung sowohl der Serum- als auch der Liquorkonzentration der VP1-spezifischen IgG-Antikörper und der Berechnung eines Antikörperspezifitätsindex, lässt sich eine PML mit einer der PCR vergleichbaren Sensitivität und Spezifität von 76% bzw. 98% nachweisen (REIBER und LANGE, 1991; WEBER et al., 1997). KNOWLES et al. publizierten die Methode des MACRIA (M-antibody capture radioimmunoassay) zum serologischen Nachweis von JC-Virus-spezifischem IgM (KNOWLES et al., 1992). Er ist sensitiver als die herkömmliche Methode des HI (haemagglutination inhibition test; Hämagglutinations-Hemm-Test) oder die Immunelektronenmikroskopie (GIBSON et al., 1981). Außerdem wurde JC-Virus-spezifisches IgM in JCV-infizierten humanen fetalen Gliazellen (PADGETT und WALKER, 1983) und in menschlichen Amnionzellen (DANIEL et al., 1981) über indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen.

1.3 Ziel der Arbeit

Ein ELISA zum Nachweis von JC-Virus- bzw. VP1-VLP-spezifischem IgM wäre ein einfaches serologisches Verfahren ohne Verwendung von radioaktiven Isotopen, um eine akute bzw. reaktivierte Infektion mit JCV nachzuweisen. Durch serologische Screening-Untersuchungen könnte die Frage, mit welcher Krankheit eine akute Infektion mit JCV assoziiert ist, rasch beantwortet werden. Damit liesse sich ebenfalls die Rolle der JCV-Infektion bei der Transplantatabstossung, etwa der Niere, näher charakterisieren. Ein solcher Test kann dazu beitragen, die Primärinfektion mit JC-Virus zu erkennen, oder bei Auftreten PML-typischer Symptome eine akute Infektion mit JC-Virus bzw. eine Reaktivierung auszuschließen. Da bereits ein ELISA zum Nachweis von IgG existiert, ist das Ziel dieser Arbeit die Entwicklung eines ELISA-Verfahrens zum Nachweis von VP1-VLP-spezifischen IgM-Antikörpern im menschlichen Serum.

2 Materialien und Methoden

2.1 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbant Assay)

Alle verwendeten Puffer sind unter 6.4.1 aufgeführt.

2.1.1 Expression des rekombinanten Virusproteins 1 (VP1) in Sf (Spodoptera frugiperda) 158-Zellen für den Einsatz im ELISA

Das Hauptstrukturprotein VP1 des JC-Virus wurde mit Hilfe von rekombinanten Baculoviren in der Insektenzellinie Sf 158 exprimiert. VP1 wurde sowohl im Zellextrakt als auch im Zellkulturüberstand nachgewiesen, wobei die höchste Expression fünf Tage nach der Infektion beobachtet wurde.

Das rekombinante VP1-VLP wurde durch ein Zwei-Schritt-Verfahren aus dem Zellextrakt und dem Zellkulturüberstand isoliert. Dazu erfolgte die Sedimentation durch eine 40% iges Saccharosekissen, an die sich eine zweite Zentrifugation durch einen Stufengradienten aus 40% Saccharose und 50% Metrizamid anschloß. Die VP1-VLP, die in dem Pellet nach der letzten Zentrifugation enthalten waren, bestanden aus zwei Hauptproteinen mit einem Molekulargewicht von 42 bzw. 40 kDa und einem weiteren Protein von 38 kDa. Durch einen Western Blot mit Anti-Simian-Virus 40 (SV 40) Hyperimmunserum (WEBER et al., 1994) wurde das VP1-spezifische 42 kDa-Protein als die hauptsächliche immunoreaktive Komponente identifiziert.

Diese VP1-VLP wurden in allen Tests der vorliegenden Arbeit verwendet.

2.1.2 ELISA-Platten

Es wurden fünf verschiedene Platten der Firma Nunc (Roskilde, Dänemark) (Bestellnummern: 475078, 468667, 445101, 475086 und 467679) für den 1995 entwickelten und etablierten ELISA zum Nachweis von IgG-Antikörpern gegen VP1-VLP (siehe 2.1.3) getestet. Seren von acht Patienten mit neurologischen Krankheitsbildern (siehe 6.5), bei denen mittels dieses ELISA IgG-Antikörper gegen VP1-VLP nachgewiesen worden waren, wurden zur Erstellung eines Referenzserums gepoolt. In diesem Referenzserum wurden

nach der von TREBST beschriebenen Methode (TREBST, 1995) IgGAntikörper gegen VP1-VLP nachgewiesen, um so die Eignung der Platten zu prüfen.

2.1.3 ELISA zum Nachweis von IgG-Antikörpern gegen VP1-VLP

Für diesen ELISA wurde die Platte mit 400 ng VP1-VLP in 100 µl Beschichtungspuffer pro Napf beschichtet. Jeder zweite Riegel wurde nur mit dem Puffer beschichtet, um als Negativkontrolle zu dienen. Die Platte wurde über Nacht bei 4°C gelagert. Anschließend wurde sie dreimal eine Minute mit PBS-Waschpuffer bei Raumtemperatur mit Hilfe der Waschapparatur Nunc-Immuno[™] Wash 12 (Kat.Nr. 455492; Nunc, Roskilde) gewaschen. Nun folgte ein Blockierungsschritt mit 200 µl BLOTTO pro Napf bei 37°C für eine Stunde. Anschließend wurde das gepoolte Referenzserum (siehe 2.1.2) in log 2-Verdünnungsstufen von 1:1250 bis 1:160000 in 100 µl BLOTTO pro Napf aufgetragen und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Es folgte dreimaliges Waschen für jeweils eine Minute mit PBS-Waschpuffer und anschließend wurde mit einem Peroxidase-konjugierten Antikörper der Ziege, der gegen menschliches IgG gerichtet ist (Code-Nr.:109-035-003, Lot-Nr.:087H4832; Dianova, Hamburg) in der Konzentration 1:5000 in 100 µl BLOTTO pro Napf beschichtet. Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C wurden diese Waschschritte dreimal wiederholt.

Die Färbung wurde gemäß den Anweisungen des Herstellers mit einer TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine)-Arbeitslösung (Boehringer, Mannheim) mit einer Endkonzentration von 0,42 mmol/l TMB durchgeführt. Dies entspricht 100 µl TMB in 10 ml Citrat-Puffer (pH 5,5) in Anwesenheit von 0,9 µl Wasserstoffperoxid (30%) (Merck, Darmstadt) für eine Platte. Unter Lichtabschluß erfolgte die enzymatische Reaktion für 25 min. Sie wurde durch Zugabe von 100 µl einer 1 molaren Schwefelsäurelösung (Merck, Darmstadt) gestoppt, wobei die Farbe der positiven Ansätze von einem blauen in einen gelben Farbton umschlug. Zur Bestimmung der Intensität der Färbung wurden die Platten im Photometer (MR 7000 Platten-Lesegerät; Dynatech Laboratories, Denkendorf) gemessen. Die Extinktion wurde bei

zwei verschiedenen Wellenlängen (450 nm und 690 nm) bestimmt und die Differenz berechnet.



Abbildung 1: Schematische Darstellung des ELISA zum Nachweis von IgG-Antikörpern gegen VP1-VLP

2.2 Direkte ELISA-Verfahren zum Nachweis von VP1-VLPspezifischem IgM

2.2.1 Direkter ELISA mit einem polyklonalen Peroxidase-konjugierten Detektionsantikörper

Für diesen direkten ELISA wurden Platten der Firma Nunc (MaxiSorb Nr. 445101) verwendet. Sie wurden mit 700 ng VP1-VLP in 100 µl Beschichtungspuffer pro Napf beschichtet, wobei jeder zweite Riegel freigelassen wurde, um als Negativkontrolle zu dienen, und mindestens über Nacht (maximal drei Nächte) bei 4°C gelagert. Anschließend wurden die Platten dreimal mit Waschpuffer für jeweils eine Minute bei Raumtemperatur mit Hilfe der Waschapparatur Nunc-Immuno[™] Wash 12 (Kat.Nr. 455492; Nunc, Roskilde) gewaschen.

Nun wurden potenzielle freie Bindungsstellen mit 200 µl BLOTTO pro Napf bei 37°C für eine Stunde abgesättigt. Danach wurde dreimal mit Waschpuffer gewaschen und dann mit menschlichem Referenzserum (siehe 3.5.1), das in log-2-Verdünnungsstufen von 1: 5000 bis 1: 640000 aufgetragen wurde, und mit einem IgM-Standard-Serum (Produkt.-Nr: I 8260; Sigma-Aldrich, Deisenhofen), jeweils in 100 µl BLOTTO verdünnt, beschichtet. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde, die Temperatur lag bei 37°C.

Nach erneutem dreimaligen Waschen mit Waschpuffer wurden die Platten mit Peroxidase-konjugiertem Ziegenantikörper gegen menschliches IgM (Code-Nr.: 109-035-043; Dianova, Hamburg) als Detektionsantikörper in einer Konzentration von 1:5000 in 100 µl BLOTTO pro Napf beschichtet. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurden die Platten dreimal mit Waschpuffer gewaschen.

Die Färbung wurde gemäß den Anweisungen des Herstellers mit einer TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine)-Arbeitslösung (Boehringer, Mannheim) mit einer Endkonzentration von 0,42 mmol/l TMB durchgeführt. Dies entspricht 100 µl TMB in 10 ml Citrat-Puffer (pH 5,5) in Anwesenheit von 0,9 µl Wasserstoffperoxid (30%) (Merck, Darmstadt) für eine Platte. Unter Lichtabschluß erfolgte die enzymatische Reaktion für 25 min. Sie wurde durch Zugabe von 100 µl einer 1 molaren Schwefelsäurelösung (Merck, Darmstadt) gestoppt, wobei die Farbe der positiven Ansätze von einem blauen in einen gelben Farbton umschlug. Zur Bestimmung der Intensität der Färbung wurden die Platten im Photometer (MR 7000 Platten-Lesegerät; Dynatech Laboratories, Denkendorf) gemessen. Die Extinktion wurde bei zwei verschiedenen Wellenlängen (450 nm und 690 nm) bestimmt und die Differenz berechnet.



Abbildung 2: Schematische Darstellung des direkten ELISA mit einem polyklonalen Peroxidase-konjugierten Detektionsantikörper

2.2.2 Direkter ELISA mit einem Alkalische-Phosphatase-konjugierten Detektionsantikörper

Der Versuchsablauf entsprach bis auf folgende Modifikationen dem unter 2.2.1 beschriebenen Protokoll. Die Waschschritte wurden mit TBS-Waschpuffer durchgeführt, um eine Hemmung der alkalischen Phosphatase zu verhindern. Als Detektionsantikörper wurde ein mit alkalischer Phosphatase konjugierter monoklonaler Antikörper der Maus gegen menschliches IgM, der eine µ-Ketten-Spezifität aufwies (Produkt-Nr.: A 2189; Sigma-Aldrich, Deisenhofen), verwendet. Dieser Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:5000 in 100 µl BLOTTO pro Napf eingesetzt und die Inkubation erfolgte über eine Stunde bei 37°C. Als Substrat diente pNPP (p-Nitrophenol-Phosphat) als gebrauchsfertige Arbeitslösung der Sigma-Aldrich, Deisenhofen und die Entwicklungszeit betrug 30 min.

Die Reaktion wurde mit 3 N NaOH (Merck, Darmstadt) gestoppt und positive Ansätze waren durch eine gelbe Färbung gekennzeichnet. Anschließend wurde im Photometer (MR 7000 Platten-Lesegerät; Dynatech Laboratories, Denkendorf) bei einer Wellenlänge von 405 nm und 490 nm die Extinktion gemessen und die Differenz berechnet.



Alkalische Phosphatasekonjugierter Antikörper der Ziege gegen menschliches

Anti-VP1-IgM

VP1-VLP

Abbildung 3: Schematische Darstellung des direkten ELISA mit einem Alkalische-Phosphatase-konjugierten Detektionsantikörper

2.3 Capture-Assays zum Nachweis von VP1-VLP-spezifischem IgM

2.3.1 Gewinnung von VP1-VLP-spezifischem IgG des Kaninchens für den Einsatz im IgM-capture-ELISA

Zur Herstellung des Hyperimmunserums wurde ein Kaninchen mit rekombinantem VP1-VLP wie beschrieben immunisiert und auf diese Weise ein Hyperimmunserum produziert (WEBER et al., 1994).

2.3.1.1 Affinitätschromatographische Reinigung von IgG aus dem Hyperimmunserum

Zur Gewinnung des reinen IgG aus dem Hyperimmunserum wurde eine Affinitäts-Chromatographie mit Protein G mit Hilfe eines kommerziellen Kits (Mab Trap^R G II; Pharmacia Biotech, Freiburg) gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Es wurden fünf Fraktionen zu je fünf Tropfen des Eluates getrennt aufgefangen. Unter Durchführung eines ELISA (siehe 2.3.1.2) wurde die IgG-Konzentration in den fünf Fraktionen bestimmt. Diejenige Fraktion, die im ELISA die höchste IgG-Konzentration aufwies (0,94 μ g/ μ I), wurde 1:50.000 verdünnt und anschließend im IgM-capture-ELISA eingesetzt.

2.3.1.2 Direkter ELISA zum Nachweis von IgG in den Fraktionen

Für diesen ELISA wurde die Platte MaxiSorb Nr. 445101 (Nunc, Roskilde) verwendet. Sie wurde mit einem Antikörper der Ziege gegen das Fc-Fragment des Kaninchen IgG (Code-Nr.: 111-005-008; Dianova, Hamburg) beschichtet, der 1:50000 in Beschichtungspuffer verdünnt wurde. Jeder zweite Riegel wurde nur mit dem Puffer beschichtet, um als Negativkontrolle zu dienen. Die Platte wurde über Nacht bei 4°C gelagert. Anschließend wurde sie dreimal mit PBS-Waschpuffer eine Minute bei Raumtemperatur mit Hilfe der Waschapparatur Nunc-Immuno[™] Wash 12 (Kat.Nr. 455492; Nunc, Roskilde) gewaschen. Nun folgte ein Blockierunsschritt mit 200 µl BLOTTO pro Napf bei 37°C für eine Stunde. Anschließend wurde mit einem kommerziellen IgG-Standard (Produkt-Nr.: I 5006; Sigma-Aldrich, Deisenhofen), der im ersten Riegel in log 2-Verdünnungsstufen von 1 µg bis 7,83 ng in 100 µl BLOTTO pro Napf aufgetragen wurde, und mit den fünf erhaltenen Eluaten in log 2-Verdünnungsstufen von 1:100 bis 1:12800 in 100 µl BLOTTO pro Napf beschichtet. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde, die Temperatur lag bei 37°C. Es folgte dreimaliges Waschen mit Waschpuffer für jeweils eine Minute. Anschließend wurde mit einem Antikörper der Ziege gegen das F(ab`)₂-Fragment des Kaninchen IgG, der mit Peroxidase konjugiert ist (Code-Nr.: 111-035-047; Dianova, Hamburg), in der Konzentration 1:15000 in 100 µl BLOTTO pro Napf beschichtet. Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C wurde wiederum dreimal mit Waschpuffer gewaschen.

Die Färbung wurde gemäß den Anweisungen des Herstellers mit einer TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine)-Arbeitslösung (Boehringer, Mannheim) mit einer Endkonzentration von 0,42 mmol/l TMB durchgeführt. Dies entspricht 100 µl TMB in 10 ml Citrat-Puffer (pH 5,5) in Anwesenheit von 0,9 µl Wasserstoffperoxid (30%) (Merck, Darmstadt) für eine Platte. Unter Lichtabschluß erfolgte die enzymatische Reaktion für 25 min. Sie wurde durch Zugabe von 100 µl einer 1 molaren Schwefelsäurelösung (Merck, Darmstadt) gestoppt, wobei die Farbe der positiven Ansätze von einem blauen in einen gelben Farbton umschlug. Zur Bestimmung der Intensität der Färbung wurden die Platten im Photometer (MR 7000 Platten-Lesegerät; Dynatech Laboratories, Denkendorf) gemessen. Die Extinktion wurde bei zwei verschiedenen Wellenlängen (450 nm und 690 nm) bestimmt und die Differenz berechnet.

2.3.2 Capture-ELISA mit einem polyklonalen Beschichtungsantikörper

Für den IgM-capture-ELISA wurde die Platte MaxiSorb Nr. 445101 (Nunc, Roskilde, Dänemark) verwendet. Sie wurde mit einem polyklonalen Ziegenantikörper, der gegen menschliches IgM (µ-Ketten spezifisch) gerichtet und 1:5000 verdünnt ist (Code-Nr.: A 475; DAKO, Glostrup, Dänemark), in jeweils 100 µl Beschichtungspuffer pro Napf beschichtet und über Nacht (maximal 18 h) bei 4°C gelagert. Anschließend wurde die Platte dreimal mit Waschpuffer mit Hilfe der Waschapparatur gewaschen.

Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 200 μ l BLOTTO pro Napf bei 37°C für eine Stunde abgesättigt. Danach wurde erneut dreimal mit Waschpuffer gewaschen und dann mit humanem Referenzserum (siehe 3.5.1) in log-2-Verdünnungsstufen von 1:5000 bis 1:640000 in BLOTTO, mit Patientenseren in einer 1:50-Verdünnung in 100 μ l BLOTTO pro Napf und mit IgM-Standard-Serum (Produkt-Nr.: I 8260; Sigma-Aldrich, Deisenhofen), das 1:1000 in 100 μ l BLOTTO pro Napf verdünnt wurde, beschichtet. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde, die Temperatur lag bei 37°C.

Es folgte dreimaliges Waschen mit Waschpuffer und anschließend wurde mit VP1-VLP in einer Konzentration von 700 ng/Napf in 100 µl BLOTTO beschichtet, wobei jeder zweite Riegel mit reinem BLOTTO beschichtet wurde, um als Negativkontrolle zu dienen. Nachdem eine Stunde bei 37°C inkubiert worden war, wurde wiederum dreimal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend wurden 100 µl/Napf einer Verdünnung der IgG-Fraktion des Hyperimmunserums von 1:50.000 in BLOTTO aufgetragen. Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C erfolgten drei Waschgänge mit Waschpuffer.

Im Anschluß daran wurden 100 µl/Napf einer Verdünnung von 1:15000 eines mit Peroxidase konjugierten Ziegenantikörpers, der gegen IgG des Kaninchens gerichtet ist (Code-Nr.: 111-035-047;Dianova, Hamburg), in BLOTTO aufgetragen und eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Es folgte erneutes dreimaliges Waschen mit Waschpuffer und anschließend wurde die Färbung gemäß den Anweisungen des Herstellers mit einer TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine)-Arbeitslösung (Boehringer, Mannheim) mit einer Endkonzentration von 0,42 mmol/l TMB durchgeführt. Dies entspricht 100 µl TMB in 10 ml Citrat-Puffer (pH 5,5) in Anwesenheit von 0,9 µl Wasserstoffperoxid (30%) (Merck, Darmstadt) für eine Platte. Unter Lichtabschluß erfolgte die enzymatische Reaktion für 25 min. Sie wurde durch Zugabe von 100 µl einer 1 molaren Schwefelsäurelösung (Merck, Darmstadt) gestoppt, wobei die Farbe der positiven Ansätze von einem blauen in einen gelben Farbton umschlug. Zur Bestimmung der Intensität der Färbung wurden die Platten im Photometer (MR 7000 Platten-Lesegerät;

Dynatech Laboratories, Denkendorf) gemessen. Die Extinktion wurde bei zwei verschiedenen Wellenlängen (450 nm und 690 nm) bestimmt und die Differenz berechnet.



Abbildung 4: Schematische Darstellung des Capture-ELISA mit einem polyklonalen Beschichtungsantikörper

2.3.3 Capture-ELISA mit einem monoklonalen Beschichtungsantikörper

Der Versuchsablauf entspricht bis auf folgende Modifikation dem unter 2.3.2 beschriebenen IgM-capture-ELISA mit einem polykonalen Beschichtungsantikörper. Im ersten Arbeitsschritt wurde mit einem monoklonalen gegen menschliches IgM gerichteten Antikörper der Maus (µ-Ketten spezifisch) (Produkt-Nr.: I 6385; Sigma-Aldrich, Deisenhofen) in der Konzentration 1:5000 in jeweils 100 µl Beschichtungspuffer pro Napf beschichtet und über Nacht, maximal 18 h, bei 4°C gelagert. Die anderen Arbeitsschritte waren identisch.



Abbildung 5: Schematische Darstellung des Capture-ELISA mit einem monoklonalen Beschichtungsantikörper

2.4 Indirekter ELISA mit einem Detektionssystem aus zwei Antikörpern zum Nachweis von VP1-VLP-spezifischem IgM

Nach der Beschichtung mit 700 ng rekombinantem VP1-VLP in 100 μ L BLOTTO je Napf über Nacht bei +4°C wurden die Platten dreimal mit PBS-Waschpuffer gewaschen. Dann wurden die Platten bei 37°C für eine Stunde mit dem Referenzserum (siehe 3.5.1), das in log-2-Verdünnungsstufen von 1:5000 bis 1: 640000 aufgetragen wurde, den Patientenseren, 1:500 verdünnt, und dem 1:1000 verdünnten IgM-Standard (Produkt-Nr:: I 8260; Sigma-Aldrich, Deisenhofen) als Negativkontrollserum in jeweils 100 μ l BLOTTO pro Napf inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Waschpuffer wurden die Platten mit einem monoklonalen Antikörper der Maus gegen menschliches IgM (Produkt-Nr.: I 6385; Sigma-Aldrich, Deisenhofen) 1:5000 in BLOTTO verdünnt, mit 100 μ L je Napf beschichtet und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Waschpuffer wurden die Platten mit je 100 μ L pro Napf eines 1:5000 in BLOTTO verdünnten Ziegenantikörpers gegen IgG der Maus (Code-Nr.: 115-035-100; Dianova, Hamburg) inkubiert.

Die Färbung wurde gemäß den Anweisungen des Herstellers mit einer TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine)-Arbeitslösung (Boehringer, Mannheim) mit einer Endkonzentration von 0,42 mmol/I TMB durchgeführt. Dies entspricht 100 µl TMB in 10 ml Citrat-Puffer (pH 5,5) in Anwesenheit von 0,9 µl

Wasserstoffperoxid (30%) (Merck, Darmstadt) für eine Platte. Unter Lichtabschluß erfolgte die enzymatische Reaktion für 25 min. Sie wurde durch Zugabe von 100 µl einer 1 molaren Schwefelsäurelösung (Merck, Darmstadt) gestoppt, wobei die Farbe der positiven Ansätze von einem blauen in einen gelben Farbton umschlug. Zur Bestimmung der Intensität der Färbung wurden die Platten im Photometer (MR 7000 Platten-Lesegerät; Dynatech Laboratories, Denkendorf) gemessen. Die Extinktion wurde bei zwei verschiedenen Wellenlängen (450 nm und 690 nm) bestimmt und die Differenz berechnet.



Abbildung 6: Schematische Darstellung des indirekten ELISA mit einem Detektionssystem aus zwei Antikörpern zum Nachweis von VP1-VLPspezifischem IgM

2.5 Analyse von Patientenseren auf IgM-Antikörper gegen VP1-VLP im indirekten ELISA mit einem Detektionssystem aus zwei Antikörpern

2.5.1 Patientenseren

Das Institut für Laboratoriumsmedizin, Mikrobiologie und Transfusionsmedizin (ILMT) des Marienkrankenhauses Hamburg stellte ein unausgewähltes Kollektiv menschlicher Seren zur Verfügung, an dem ein Screening auf IgM-Antikörper gegen VP1-VLP durchgeführt wurde. Es handelte sich dabei um 383 Seren, die entweder direkt am Tag der Entnahme oder nach einer Lagerung bei +4°C (maximal drei Tage) im ELISA eingesetzt wurden.

2.5.2 Referenzkurve

Parallel zu den Patientenproben wurde auf jeder Platte ein sicher positives Serum als Referenzserum mitgeführt, das zuvor in London von W. KNOWLES und Mitarbeitern mittels eines Radioimmunoassay (KNOWLES et al., 1992) und anschließend im indirekten ELISA mit einem Detektionssystem aus zwei Antikörpern auf gegen JC-Virus gerichtetes IgM getestet wurde. Aus den Ergebnissen der Messungen im ELISA wurde eine Referenzkurve erstellt. Aliquots des Referenzserums wurden in 50% igem Glyzerin bei –80°C gelagert und lediglich einmal eingesetzt. Es wurde in acht log2-Verdünnungsstufen von 1:5000 bis 1:640000 aufgetragen.

2.5.3 Versuchsablauf

Der Versuchsablauf entspricht dem unter 2.4 beschriebenen ELISA. Das Referenzserum wurde wie unter 2.5.2 beschrieben aufgetragen und es wurden pro Platte zwei Näpfe mit IgM-Standard belegt, der 1:1000 in 100 µl BLOTTO pro Napf verdünnt wurde, von denen ein Napf mit VP1-VLP beschichtet war und einer mit reinem Puffer. Es wurden 39 Seren pro Platte gemessen. Jedes Serum wurde 1:5000 in 100 µl BLOTTO pro Napf verdünnt und ebenso wie der IgM-Standard in jeweils zwei Näpfen aufgetragen. Pro Versuchstag wurde eine Platte bearbeitet.

2.5.4 Bestimmung der unteren Nachweisgrenze

Für diese Arbeit wurden die acht niedrigsten Messwerte im positiven Bereich aus den 383 Patientenmessungen ermittelt und die Messung dieser acht Seren noch zweimal wiederholt. So erhielt man 24 Werte, die als Grundlage für die Bestimmung der unteren Nachweisgrenze dienten. Der Mittelwert dieser 24 Werte zuzüglich der fünffachen Standardabweichung wurde als untere Nachweisgrenze festgelegt.(CUTLER und WRIGHT, 1989; WEBER et al., 1997).



Erläuterung: MW = Mittelwert; SAW = Standardabweichung

Abbildung 7: Darstellung der Extinktionen der 24 negativen Messwerte zur Ermittlung der unteren Nachweisgrenze

2.5.5 Auswertung

Ein Versuch wurde als verwertbar betrachtet, wenn das Referenzserum in der niedrigsten Verdünnung von 1:5000 einen sicher positiven Extinktionswert aufwies und mit steigender Verdünnung ein gleichmäßiger Abfall der Kurve zu erkennen war. Weiterhin musste der Extinktionswert des IgM-Standards unter 0,1 liegen und somit sicher in den negativen Bereich fallen. Waren diese Bedingungen erfüllt, wurden die erhaltenen Messwerte im Hinblick auf die untere Nachweisgrenze betrachtet und als positiv oder negativ bewertet.

2.6 Analyse der positiven Patientenseren auf IgG-Antikörper gegen VP1-VLP

Die vier positiven Patientenseren wurden zusätzlich auf IgG-Antikörper gegen VP1-VLP getestet. Das Versuchsprotokoll entspricht bis auf folgende Modifikation dem unter 2.1.3 beschriebenen ELISA. Zusätzlich zu dem Referenzserum wurden in demselben Arbeitsschritt die vier Patientenseren

(C R, K H, W S und Z H (siehe Tab.1)), die 1:500 in jeweils 100 µl BLOTTO pro Napf verdünnt wurden, auf die Platte aufgetragen und wie das Referenzserum für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

2.7 Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot

Alle verwendeten Puffer sind unter 6.4.2 aufgeführt.

2.7.1 Gießen der Gele

Die Auftrennung der Proteingemische erfolgte durch Elektrophorese in diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen in Gegenwart von Dodecylsulfat Natriumsalz (SDS) (LAEMMLI, 1970).

Es wurden 0,75 mm dicke und 5 cm lange Trenngele (4 ml Acrylamid/Bis (Sigma-Aldrich, Deisenhofen), 3,35 ml H₂O, 2,5 ml Tris-HCl (Tris: Sigma-Aldrich, Deisenhofen; HCl (Salzsäure): Merck, Darmstadt) pH 8,8, 100 μ l 10 % [w/v] SDS) sowie 2 cm lange Sammelgele (0,65 ml Acrylamid/Bis, 3,05 ml H₂O, 1,25 ml Tris-HCl pH 6,8, 50 μ l 10 % [w/v] SDS) verwendet. Zur Polymerisation wurden unmittelbar vor dem Gießen der Gele 50 μ l 10% [w/v] Ammoniumpersulfat (APS; Sigma-Aldrich, Deisenhofen) und 5 μ l 99% [v/v] N,N,N',N',-Tetramethylenethyldiamin (TEMED; Sigma-Aldrich, Deisenhofen) zu 9,95 ml Trenngel bzw. 25 μ l 10% APS und 5 μ l TEMED zu 5 ml Sammelgel gegeben.

2.7.2 Auftragen der Proteingemische und Elektrophorese

Die zu trennenden Proteingemische wurden in 0,9 % Natriumchlorid-Lösung (NaCl; Merck, Darmstadt) auf die gewünschte Konzentration verdünnt und an reduzierendem Proben-Puffer im Verhältnis 5/1 für 4 min auf 95°C erhitzt. Anschließend erfolgte das Auftragen auf das Sammelgel.

Auf jedes Gel wurde zudem ein vorgefärbter Molekulargewichtsmarker (prestained SDS-Page standard, MW 25 000-127 000 kDa; Sigma-Aldrich, Deisenhofen), im Verhältnis 5/1 mit Probenpuffer vermischt und aufgekocht, aufgetragen.

Die Elektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 60 mA pro Gel und einer konstanten Spannung von 200 V in einem mit Lauf-Puffer gefüllten mini

protean II cell Apparat (BioRad, München) für ca. 45 min durchgeführt, bis die Bromphenolblaubande das untere Ende des Gels erreicht hatte.

2.7.3 Western-Blot

Nach der Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde das Gel zum Transfer der aufgetrennten Proteine mit einer zuvor in Transfer-Puffer befeuchteten 0,45 µm dicken Nitrocellulose-Membran (Schleicher&Schuell, Dassel) und luftblasenfrei zwischen je bedeckt drei Lagen Filterpapier (Schleicher&Schuell, Dassel) und zwei Lagen Schaumstoffmatten gelegt. Der Transfer wurde vertikal zwischen zwei Kunststoffgittern in einem mit Transfer-Puffer gefüllten Puffertank (Trans-Blot Cell; BioRad, München) durchgeführt. Bei dem Transfer, der mit 250 mA const. 16 Stunden bei Kühlung auf 4°C durchgeführt wurde, war die Nitrocellulose-Membran der Anode zugewandt.

2.7.4 Nachweis von VP1-VLP-spezifischem IgM

Vor der Inkubation mit den verschiedenen Antikörpern wurde die Nitrocellulose-Membran zunächst bei Raumtemperatur für 30 min in BLOTTO inkubiert, um die freien Bindungsstellen zu blockieren. Dann wurde sie mit dem zu testenden 1:100 in BLOTTO verdünnten Patientenserum für 2 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend mehrmals sorgfältig mit PBS gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen.

Anschließend erfolgte die Inkubation mit einem in BLOTTO verdünnten monoklonalen Antikörper der Maus gegen menschliches IgM (Produkt-Nr.: I 6385; Sigma-Aldrich, Deisenhofen) in der Konzentration 1:2500 für eine Stunde bei 37°C, worauf dreimaliges Waschen mit PBS folgte.

Zur Sichtbarmachung spezifischer Banden wurde die Membran mit einem Peroxidase-gekoppelten Antikörper der Ziege gegen IgG der Maus (Code-Nr.: 115-035-100 Dianova, Hamburg) in der Konzentration 1:5000 in BLOTTO für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Nach anschließendem gründlichen Waschen mit PBS und einem Waschgang mit Carbonat-Puffer wurde eine Acetat-Färbung durchgeführt. Dazu wurden 4 ml Natriumacetat-Puffer, 10 ml 0,25% (w/v) 9-Aminoethylcarbazol (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) und 50 µl 30% (v/v) Wasserstoffperoxid

(Merck,Darmstadt) auf 40 ml H_2O gegeben und die Membran in dieser Lösung 20 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von H_2O beendet und die Membran zwischen zwei Lagen Filterpapier getrocknet.

3 Ergebnisse

3.1 ELISA-Plattenauswahl

Aus dem gepoolten Referenzserum, das IgG-Antikörper gegen VP1-VLP enthielt, wurde bei den unterschiedlichen Messungen jeweils eine Standardkurve erstellt (Abbildung 8). Die Eignung der fünf unterschiedlichen Platten Nr. 475078, 468667, 445101, 475086 und 467679 der Firma Nunc (Roskilde, Dänemark) für diesen Test ergab sich daraus, dass die Extinktionswerte der positiven Ansätze in einem meßbaren Bereich lagen, die Verdünnungsechtheit über acht log-2-Stufen erhalten blieb und die Reproduzierbarkeit der Standardkurven gewährleistet war. Die Platten Nr. 475078 und 445101 wurden noch einmal einzeln im direkten Vergleich getestet (Abbildung 9). Als Platte mit den zuverlässigsten und konstant reproduzierbaren Ergebnissen stellte sich die Nunc-MaxiSorb Nr. 445101 heraus. Diese wurde ebenfalls für die ELISAs zum Nachweis von IgM-Antikörpern gegen VP1-VLP benutzt, bei denen die Platte, ebenso wie zum Nachweis von IgG, mit VP1-VLP als Antigen beschichtet wurde.

Für den IgM-capture-ELISA, bei dem mit einem Antikörper der Maus beschichtete wurde, empfahl der Hersteller wegen ihrer hohen Bindungskapazität ebenfalls diese Plattenart zu nutzen, woraufhin sie auch für diesen Test eingesetzt wurde.



Abbildung 8: Standardkurven der fünf getesteten ELISA-Platten



Abbildung 9: Standardkurven der Platten 475078 und 445101 im direkten Vergleich

3.2 Direkte ELISA-Verfahren zum Nachweis von VP1-VLPspezifischem IgM

3.2.1 Direkter ELISA mit einem polyklonalen Peroxidase-konjugierten Detektionsantikörper

In diesem Test war eine Reaktivität des Referenzserums und der eingesetzten Patientenseren zu erkennen, jedoch war der Hintergrundwert in den Negativkontrollen (jeder zweite Riegel) sehr hoch. An der Referenzkurve ließ sich kein eindeutiger Abfall der Extinktionswerte bei Erhöhung des Verdünnungsfaktors feststellen und die Werte waren insgesamt so niedrig (0,191-0,054), dass keine positive Reaktion zu erkennen war.

3.2.2 Direkter ELISA mit einem monoklonalen alkalische Phosphatasekonjugierten Detektionsantikörper

Bei diesem Versuch wurde ein monoklonaler Detektionsantikörper mit alkalischer Phosphatase als Konjugat getestet. Die Ergebnisse waren unbefriedigend, da sehr große Hintergrundwerte in den Negativkontrollriegeln zu erkennen waren. Die Messwerte waren insgesamt niedrig. Die Referenzkurve war nicht zu verwerten, da sie bei Extinktionswerten zwischen 0,796 und -0,580 keinen gleichmäßigen Abfall erkennen ließ.



Abbildung 10: Referenzkurve (Serum Nr. 81/11455) im direkten ELISA mit einem monoklonalen alkalische Phosphatase-konjugierten Detektionsantikörper

3.3 Capture-ELISA-Verfahren zum Nachweis von VP1-VLPspezifischem IgM

3.3.1 IgM-capture-ELISA mit einem polyklonalen Beschichtungsantikörper

Die Extinktionswerte waren in diesem Test insgesamt sehr niedrig und es ließ sich nicht zwischen Referenzserum, Negativkontrollen in den nicht beschichteten Kontrollriegeln und den aufgetragenen teils positiven, teils negativen Patientenseren unterscheiden. Die zehn Kontrollseren aus London (siehe 6.6) erbrachten nur negative Extinktionswerte, die nicht mit den Ergebnissen im Radioimmunoassay korrelierten. Teilweise waren die Werte in den Negativkontrollriegeln höher, als die Werte der als positiv vorgetesteten Kontrollseren. In einigen Messungen sah es so aus, als gäbe es eine spezifische Reaktivität, doch bei der Wiederholung erwiesen sich die erhaltenen Werte als nicht reproduzierbar. Eine verwertbare Referenzkurve ließ sich nicht erstellen und somit ist auch dieser Test für Patientenmessungen ungeeignet.

3.3.2 Capture-ELISA mit einem monoklonalen Beschichtungsantikörper

Anstatt eines polyklonalen Beschichtungsantikörpers wurde bei dieser Methode ein monoklonaler Beschichtungsantikörper verwendet. Ansonsten war der Versuchsablauf zu 3.3.1 identisch. Es wurden deutlich negative Werte in den Negativkontrollriegeln (jeder zweite Riegel auf der Platte) erreicht, jedoch zeigte von den acht Seren, die zuvor im Radioimmunoassay getestet worden waren (siehe 6.6) und hier als Kontrolle fungierten, in der Verdünnung von 1:500 keines eine Reaktivität, die mit den Ergebnissen des Radioimmunoassay (siehe 6.6) korrelierte. Eine Referenzkurve ließ sich nicht erstellen und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse war bei diesem Test nicht gewährleistet. Somit war dieses Verfahren für die weitere Verwendung als ELISA für den Nachweis von VP1-VLP-spezifischen IgM-Antikörpern nicht geeignet.

3.4 Indirekter ELISA mit einem Detektionssystem aus zwei Antikörpern

Es wurden in der Testphase sechs der im Radioimmunoassay getesteten Patientenseren (siehe 6.6) in steigender Verdünnung gemessen. Die Ergebnisse werden in der Abbildung 11 dargestellt. Das Serum, das im Radioimmunoassay die höchste optische Dichte (OD) aufwies (Nr. 81/11455), zeigte auch in diesem ELISA die höchsten Extinktionswerte. Die anderen Werte entsprachen ebenfalls in der Tendenz den vorherigen Ergebnissen. Es ließen sich Verdünnungskurven erstellen und die erhaltenen Messwerte waren reproduzierbar.

Mit diesem ELISA wurde das Kollektiv von 383 Patienten auf IgM-Antikörper gegen VP1-VLP untersucht, wobei das Serum Nr. 81/11455 als Referenzserum verwendet wurde.


Abbildung 11: Verdünnungskurven von sechs im Radioimmunoassay vorgetesteten Seren im indirekten ELISA mit einem Detektionssystem aus zwei Antikörpern

3.5 Messergebnisse im indirekten ELISA mit einem Detektionssystem aus zwei Antikörpern

3.5.1 Referenzserum

Als menschliche Referenzseren im IgM-ELISA wurden sicher positive native Seren verwendet, die zuvor in London von W. KNOWLES und Mitarbeitern mittels eines Radioimmunoassay (KNOWLES et al., 1992) auf gegen JC-Virus gerichtetes IgM getestet waren. Es standen für diese Arbeit zehn Referenzseren zur Verfügung, die in 6.6 aufgelistet sind, von denen das mit dem höchsten im ELISA ermittelten Titer (Abbildung 11) in den Versuchen als Referenzserum diente. Dieses Serum (Nr. 81/11455) zeigte auch im Radioimmunoassay die höchste Reaktivität (siehe 6.6). Es diente als Positivkontrolle für alle Tests. Für den indirekten ELISA mit einem Detektionssystem aus zwei Antikörpern wurden aus diesem Serum Referenzkurven für alle Messungen der Patientenseren erstellt. Die folgende Abbildung zeigt die Standardkurve aus der Mittelung von 16 Referenzkurven in einer logarithmischen Darstellung.



Abbildung 12: Standardkurve des Referenzserums, über 16 Versuche gemittelt

3.5.2 Ergebnisse der Patientenmessungen

Es wurden 383 menschliche Seren, die von dem ILMT des Marienkrankenhauses in Hamburg zur Verfügung gestellt wurden, auf IgM-Antikörper gegen VP1-VLP getestet. Es handelte sich dabei um eine Screening-Untersuchung eines unausgewählten Kollektivs. Es war jede Altersgruppe vertreten und die Erkrankung, wegen der sich der Patient oder die Patientin in Behandlung befand, stellte kein Auswahlkriterium dar.

Der größte Teil der Patientenseren zeigte keine Reaktivität im ELISA. Bei 120 Seren (120 von 383, 31,3%) waren die Werte in den Negativkontrollnäpfen höher als die in den mit VP1-VLP beschichteten Näpfen, so dass das Photometer keine Messwerte angab, da es nur Differenzen bis zu einem Wert von -0,100 anzeigt. 263 Seren (263 von 383, 68,7%) erreichten Extinktionswerte über -0,100. Von den 383 Seren wurden die 38 (38 von 383, 9,92%) ausgewählt, die die höchsten Extinktionswerte im ELISA zeigten (siehe 6.7). Bei diesen wurde die Messung noch zweimal wiederholt, um die Reproduzierbarkeit der Messwerte zu überprüfen. Von diesen 38 Seren zeigten vier wiederholbar einen Extinktionswert über 0,563 (untere Nachweisgrenze), der für das Vorliegen von VP1-VLP-spezifischem IgM spricht (siehe Tabelle 1). Somit sind vier der 383 getesteten Seren in diesem ELISA als positiv zu bewerten (4 von 383, 1,04%). Für das erste dieser vier Seren (CR) lagen die Werte zwischen 1,158 und 1,949, für das zweite (KH) zwischen 0,681 und 0,791, für das dritte (WS) zwischen 1,102 und 1,229 und für das vierte (ZH) zwischen 0,495 und 1,206. Obwohl bei den Messungen des vierten Serums einer der Werte unterhalb der unteren Nachweisgrenze liegt, wurde es als positiv gewertet, weil die anderen beiden Extinktionswerte mit 1,034 und 1,206 deutlich darüber lagen.

Zwei der gemessenen Seren (2 von 383, 0,52%) erbrachten im Screening einmalig positive Messwerte (0,840 und 0,596), die sich bei der Wiederholung der Messung aber nicht reproduzieren ließen (siehe Nr. 1 und Nr. 37 in 6.7).

Initialen	Alter	Geschlecht	1.	2.	3.	Diagnose zum Zeitpunkt der
des/der			Wert	Wert	Wert	Messung
Pat.						
CR	65	m	1,949	1,285	1,158	Ureterstenose rechts bei Z.n.
						aorto-femoralem und aorto-
						iliacalem Bypass mit konsekutiver
						Pyonephrose rechts bei
						Harnstauungsniere
КН	26	w	0,791	0,681	0,791	V.a.Plazentainsuffizienz bei
						Wachstumsstillstand in der
						36.SSW
WS	55	m	1,129	1,229	1,102	Rezidivierende Harnwegsinfekte
						bei Neoblase bei Harnblasen-Ca
ΖH	48	w	1,206	0,495	1,034	Fettleberhepatitis äthyltoxischer
						Genese; diabetische
						Stoffwechsellage unter
						Kortokoidtherapie; ulceröse
						Gastritis/ Bulbitis;
						Hämorrhoidalleiden

Tabelle 1: Positive Patientenseren

Erläuterung:

Pat. = Patient/in; m = männlich; w = weiblich; Z.n. = Zustand nach; V.a. = Verdacht auf; SSW = Schwangerschaftswoche; Ca = Carcinom

Die folgende Darstellung stellt die Meßergebnisse in Form eines Box-Plot dar (Abb. 13) und zeigt, selbst unter Einschluß der Konfidenzintervalle, eine eindeutig Unterscheidung zwischen positiven und negativen Messwerten. Eine Grauzone, in der das Ergebnis nicht eindeutig als positiv oder negativ anzusehen ist, zeigt sich nicht.



Abbildung 13: Darstellung der Patientenmessungen als Box-Plot

3.6 Test der positiven Patientenseren auf IgG-Antikörper gegen VP1-VLP

Die Patientenseren, bei denen im indirekten ELISA mit einem Detektionssystem aus zwei Antikörpern IgM gegen VP1-VLP nachgewiesen worden war, wurden zusätzlich auf den Gehalt an IgG gegen VP1-VLP getestet. Die Messergebnisse finden sich in Tabelle 2.

Antikörper							
Initialen des/de	er Alter	Geschlecht	Messwert in delta				
Pat.			OD				
CR	65	m	1,301				
КН	26	W	0.345				

m

W

1.259

Tabelle 2: Ergebnisse des Tests auf VP1-VLP-spezifische IgG-Antikörper

Erläuterungen:

55

48

WS

ΖH

Pat. = Patient bzw. Patientin; delta OD = Differenz der optischen Dichte; m = männlich; w = weiblich; *** = Messwert liegt oberhalb des vom Photometer maximal angegebenen Werts

3.7 Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot

Als zweites Verfahren zur Spezifitätskontrolle des ELISA wurden eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese und ein Western-Blot durchgeführt. Hierfür wurden jeweils 70 µg des VP1-VLP in elf Bahnen in der Elektrophorese aufgetrennt. Die zehn im Radioimmunoassay auf Antikörper gegen JCV getesteten Patientenseren (siehe 6.6) wurden in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt und der Versuchsablauf entspricht der Beschreibung unter 2.7. Die Patientenseren zeigten im Western-Blot keine spezifische Reaktivität gegen das rekombinante VP1. Im Bereich von 42 kD, der Größe von VP1, zeigte sich keine Farbreaktion. Bei sechs Seren zeigte sich eine schwache Farbreaktion bei ca. 80 kD. Hiervon hatte ein Serum einen messbaren IgM-Titer im ELISA (Nr. 80/933c), bei den anderen ließ sich im ELISA kein Gehalt an VP1-spezifischem IgM nachweisen. Eine Korrelation der Messergebisse im Western-Blot mit denen im ELISA zeigt sich nicht.

4 Diskussion

4.1 Der ELISA als Nachweismethode für VP1-VLP-spezifische Antikörper

Die Eigenschaft von JCV, Erythrozyten vom Huhn, Meerschweinchen und des Menschen zu agglutinieren (PADGETT und WALKER, 1973), stellte die Grundlage für eine relativ einfache und preiswerte Methode dar, sowohl JCV-Antigen als auch gegen JCV gerichtete Antikörper zu messen. Wie PADGETT und WALKER konnten. korrelierten zeigen die im Hämagglutinations-Hemmtest (hemagglutination-inhibition test, HI-Test) erhaltenen Titer von größer als 1:32 mit neutralisierenden Eigenschaften desselben Serums im Neutralisationstest (PADGETT und WALKER, 1973). Obwohl, wie alle Hämagglutinationsassays von Viren, der HI-Test weder sehr genau noch sehr sensitiv war, bildete er die Grundlage für alle bisher durchgeführten seroepidemiologischen Untersuchungen sowie Antikörperuntersuchungen, die das JC-Virus betrafen (WALKER und FRISQUE, 1986).

Der ELISA wurde zunächst verwendet, um JC-Virionen im menschlichen Urin nachzuweisen (ARTHUR et al. 1983; ARTHUR et al., 1985). ARTHUR und SHAH berichteten 1988 erstmals über einen ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen aufgereinigte JC-Virionen in menschlichen Seren. Der ELISA hatte gegenüber dem HI-Test eine gleiche, wenn nicht höhere Sensitivität (ARTHUR und SHAH, 1988). Wahrscheinlich aufgrund der Schwierigkeiten, JCV in der Zellkultur zu vermehren (MAJOR et al., 1992) und damit ausreichende Mengen von Antigen für den ELISA zu gewinnen, wurde die Idee eines ELISA zur systematischen Untersuchung der humoralen Immunantwort gegen JCV zunächst nicht weiter verfolgt.

Der ELISA stellt jedoch ein relativ einfaches und schnell durchzuführendes Verfahren zum Nachweis von Antikörpern dar, das zudem im Vergleich zu anderen immunologischen Methoden auch kostensparend eingesetzt werden kann. Gerade für Screening-Untersuchungen eignet er sich besonders, da

mehrere Seren in einem Versuchsdurchgang gemessen werden können und der Test bei vorbeschichteter Platte nur einen Arbeitstag in Anspruch nimmt. Der ELISA zum Nachweis von VP1-VLP-spezifischem IgG wurde 1995 von C. TREBST entwickelt und etabliert. In ihren Untersuchungen erwies sich das VP1-VLP gegenüber aufgereinigten JC-Virionen als im ELISA verwendetes Antigen überlegen. Dieser Test bietet über die Bestimmung eines ASI (Anibody-Specifity Index) (REIBER und LANGE, 1991) zwischen Liquor- und Serum-Antikörpertitern eine gute diagnostische Methode zum Ausschluß einer PML (TREBST, 1995; FRYE et al., 1997). Im Serum lassen sich IgG-Antikörper gegen VP1-VLP bei ca. 80% der Bevölkerung nachweisen (WEBER et al., 1997; HOU und MAJOR, 2000). Damit ist der Durchseuchungsgrad sehr hoch. Auch bei früher durchgeführten Untersuchungen waren Kinder im Alter bis zu fünf Jahren bereits zu 45 % seropositiv für JCV. Mit zehn Jahren waren es 65 %, und bei der erwachsenen Bevölkerung fanden sich bei bis zu 85 % Antikörper gegen JCV im Hämagglutinations-Hemmtest (WALKER, 1973; TAGUCHI et al., 1982). Die Primärinfektion mit JCV scheint also ohne charakteristische Symptome in der frühen Kindheit im Sinne einer stillen Feiung zu erfolgen. In Fall der Literatur wird lediglich von einem einer schweren Meningoenzephalitis bei einem dreizehnjährigen Mädchen berichtet, bei dem die Möglichkeit einer Primärinfektion mit JCV bestanden habe (BLAKE et al., 1992). Ein ELISA zum Nachweis von IgM-Antikörpern, der mit dieser Arbeit vorgelegt wird, könnte dabei helfen, die Zusammenhänge zwischen JCV und kindlichen Meningoenzephalitiden, die Möglichkeit einer Primärinfektion mit JCV bei PML-Patienten oder den eventuell vorhandenen Zusammenhang mit anderen Infektionskrankheiten zu klären.

4.2 Probleme beim serologischen Nachweis von IgM

Der Nachweis von Antikörpern der Immunglobulinklasse M gestaltet sich schwierig. Er ist durch die Instabilität des Moleküls erschwert, wobei die richtige Lagerung der Serumproben hierbei schon ein wichtiger Faktor ist. Lagerung bei zu warmen Temperaturen oder auch Temperaturschwankungen bei Tau- und Gefrierschritten können die Struktur

des Moleküls verändern oder sogar zerstören (THOMAS, 1991). Dies hat zur Folge, dass die Reaktivität der Antikörper in nachfolgenden Tests verringert oder sogar aufgehoben sein kann. Der Prozeß der Antigenerkennung ist auch von der Konformation des Antikörpers abhängig (ROITT, 1993). Das IgM ist ein besonders labiles Molekül, da es als Pentamer in einer räumlichen Struktur vorliegt, bei der die einzelnen Stränge durch Disulfidbrücken verbunden sind, die durch äußere Einflüsse leicht verändert werden kann. Weiterhin neigt es zur Aggregatbildung, wodurch sich ebenfalls antigenerkennende Strukturen verändern oder verlegen können (ROITT, 1993). Wenn man von der Theorie der räumlichen Komplementarität von Epitop und Paratop ausgeht (ROITT, 1993), dann können sich serologische Tests, die mit mehreren Arbeitsschritten, Zugabe von Reagenzien und zwangsläufig auch großen Temperaturschwankungen einhergehen, schwierig gestalten. Man kann versuchen das Risiko der Aggregatbildung durch Zugabe von Zusatzstoffen zu vermeiden. Es steht hierfür z.B. das SDS zur Verfügung, das zu einer Denaturierung von Proteinen führt (ZEECK, 1993). Mercaptoethanol und DTT spalten Disulfidbrücken und können damit Aggregate lösen (ZEECK, 1993). Bei der hohen Empfindlichkeit des IgM ist jedoch auch immer das Risiko einer Auflösung der nativen Struktur des Antikörpers und seiner Paratope gegeben, so dass in dieser Arbeit auf den Zusatz solcher Stoffe verzichtet wurde.

Eine immunologische Kreuzreaktivität der Kapsidproteine von JCV und BKV läßt sich auf Grund der hohen Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz dieser Viren vermuten (FRISQUE et al., 1984). Seroepidemiologische Untersuchungen, bei denen Virionen von BKV und JCV zum Nachweis Kapsidprotein-spezifischer IgG Antikörper eingesetzt wurden, fanden jedoch keine Kreuzreaktivität von Antikörpern der Klasse IgG zwischen JCV und BKV Virionen bzw. Kapsidproteinen (ROLLISON et al., 2002). Damit wird auch eine Kreuzreaktivität von IgM Antikörpern zwischen BKV und JCV unwahrscheinlich.

4.3 Die verschiedenen ELISA-Verfahren zum Nachweis von VP1-VLP-spezifischem IgM

Als Testverfahren, dass am einfachsten durchzuführen ist, steht der direkte ELISA zur Verfügung, wie er auch im allgemeinen zum Nachweis von IgG angewendet wird. In der Literatur zeigt sich jedoch, dass er zum Nachweis von IgM weniger geeignet ist, da Interferenzen mit spezifischem IgG des jeweiligen Erregers oder auch mit Rheumafaktoren auftreten können (KONISHI et al., 1996; ELGH et al., 1995). Die unter 4.2 genannten allgemeinen Probleme bei dem Umgang mit IgM sind ebenfalls zu bedenken. ELGH et al. führten einen direkten ELISA zum Nachweis von Puumala Virusspezifischem IgM durch, bei dem vorher dem zu testenden nativen Serum ein RF-Absorbens (Rheumafaktorabsorbens) zugegeben wurde, um Interferenzen mit Rheumafaktoren zu vermeiden (ELGH et al., 1995). Auch in dieser Arbeit wurde ein solcher direkter ELISA ausprobiert. Dieser Test entspricht einem einfachen Sandwich-ELISA wie er auch zum Nachweis von IgG-Antikörpern gegen Puumala Virus angewendet wurde. Bei dem Versuch des Nachweises von VP1-VLP-spezifischem IgM war in diesem Test zwar eine geringe Reaktivität der eingesetzten Seren zu erkennen, jedoch war der Hintergrundwert in den Negativkontrollriegeln (jeder zweite Riegel) so hoch, dass man nicht von einer spezifischen Reaktion sprechen konnte, sondern eine unspezifische Bindung des Detektionsantikörpers an die Platte oder an das Antigen wahrscheinlicher war. Ebenso sind die oben genannten bekannten Interferenzen mit IgG oder Rheumafaktoren nicht ausgeschlossen (ELGH et al., 1995; KONISHI et al., 1996). Hierfür sprechen vor allem die hohen Hintergrundwerte. An der Referenzkurve ließ sich kein eindeutiger Abfall der Extinktionswerte bei Erhöhung des Verdünnungsfaktors feststellen. Aufgrund der unbefriedigenden Ergebnisse wurde diese Methode zunächst nicht weiter verfolgt. Da als mögliche Fehlerquelle auch der polyklonale Peroxidase-konjugierte Detektionsantikörper in Frage kommen könnte, wurde in dem zweiten direkten ELISA ein monoklonaler Detektionsantikörper mit alkalischer Phosphatase als Konjugat getestet. Dies geschah unter der Vorstellung, dass ein monoklonaler Antikörper weniger unspezifische Bindungen eingehen würde als ein polyklonaler Antikörper. Da ein mit

Peroxidase konjugierter monoklonaler Antikörper industriell nicht hergestellt wurde und somit nicht zur Verfügung stand, wurde versucht, alkalische Phosphatase für die Farbreaktion zu verwenden, da ein auf diese Weise kombinierter Antikörper käuflich zu erwerben ist. Die Ergebnisse waren jedoch unbefriedigend, da wiederum große Hintergrundwerte in den Negativkontrollriegeln im Vergleich zu den vermeintlich positiven Seren zu erkennen waren. Somit konnte man die Messwerte nicht verwerten, denn unspezifische Bindungen an die Platte oder andere Reagenzien oder wiederum Interferenzen mit spezifischem IgG oder Rheumafaktoren verhinderten wahrscheinlich ein Messen der tatsächlichen Bindung an VP1-VLP-spezifisches IgM. Die Messwerte waren insgesamt deutlich niedriger als in dem ersten ELISA, in dem Peroxidase als Konjugat verwendet wurde. Die Referenzkurve war nicht zu verwerten, da sie bei Extinktionswerten zwischen 0,796 und –0,580 keinen gleichmäßigen Abfall erkennen ließ und somit die Verdünnungsechtheit des Referenzserums nicht gegeben war. Ein solcher Detektionsantikörper mit alkalischer Phosphatase als Konjugat wurde daraufhin nicht weiter eingesetzt.

Der capture-ELISA ist eine gute und weitverbreitete Methode zum serologischen Nachweis von IgM-Antikörpern gegen unterschiedliche Erreger, wie z.B. BK-Virus, Rubella, Cytomegalievirus, Toxoplasma gondii oder Japanisches Encephalitis Virus (FLAEGSTAD et al., 1985; WIELAARD et al., 1985; REVELLO et al., 1991; WEE et al., 1992; KONISHI et al., 1996). Für diese Arbeit wurde er in Anlehnung an die Methode von E. KONISHI (KONISHI et al., 1996) durchgeführt. Das Ziel hierbei war, die Empfindlichkeit und die Meßgenauigkeit des ELISA zu erhöhen und somit eine Analyse im Hinblick auf VP1-VLP-spezifisches IgM zu ermöglichen. Die Durchführung des ELISA als IgM-capture-ELISA brachte jedoch keine Verbesserung der Messwerte. Die Extinktionswerte waren insgesamt sehr niedrig und es ließ sich nicht zwischen Referenzserum, Negativkontrollen in den nicht beschichteten Kontrollriegeln und Patientenseren unterscheiden. Teilweise waren die Werte der Negativkontrollen höher, als die der Positivkontrollen, so dass für die delta OD negative Werte angegeben wurden. In einigen Messungen sah es so aus, als gäbe es eine spezifische Reaktivität, doch bei

der Wiederholung erwiesen sich die erhaltenen Werte als nicht reproduzierbar. Eine verwertbare Referenzkurve ließ sich nicht erstellen und somit war dieser Test für Patientenmessungen ungeeignet. Die Gründe für die unbefriedigenden Ergebnisse sind wahrscheinlich in der Instabilität des IgM und den vielen Arbeitsschrittten, mit denen ein capture-Assay im Vergleich zu einem direkten ELISA verbunden ist, zu suchen. In der Literatur finden sich zahlreiche Beispiele in denen IgM erfolgreich über verschiedene Arten von Capture-Assays nachgewiesen wurde (FLAEGSTAD et al., 1985; WIELAARD et al., 1985; REVELLO et al., 1991; WEE et al., 1992; KONISHI et al., 1996), doch in diesem Fall führte dieses Verfahren nicht zum Erfolg. Daraufhin wurde versucht, die Methode zu verbessern, indem anstatt eines polyklonalen Beschichtungsantikörpers ein monoklonaler verwendet wurde. Der polyklonale Beschichtungsantikörper war zunächst benutzt worden, da zum Nachweis von BKV-spezifischem IgM in der Arbeit von FLAEGSTAD et al. ebenfalls ein solcher eingesetzt wurde (FLAEGSTAD et al., 1985). Wegen der strukturellen Ähnlichkeit von BKV und JCV wurde angenommen, dass diese Methode funktionieren könnte. Doch bei unbefriedigendem Ergebnis wurde nun ein monoklonaler Beschichtungsantikörper eingesetzt, um die Spezifität der Bindung von IgM an die beschichtet Platte zu erhöhen. Mit diesem Verfahren wurden zwar deutlich negative Werte in den Negativkontrollriegeln (jeder zweite Riegel auf der Platte) erreicht, was für weniger unspezifische Bindungen an die beschichtete Platte spricht, jedoch zeigte auch das Referenzserum als Positivkontrolle keine deutliche Reaktivität mehr. Eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse war bei diesem Test ebenfalls nicht gewährleistet und somit war er für die weitere Verwendung als ELISA für den Nachweis von VP1-VLP-spezifischem IgM ebenfalls nicht geeignet.

Da die oben beschriebenen direkten ELISA-Verfahren und auch die angewendeten Capture-Assays zu keinem befriedigenden Ergebnis führten, wurde versucht, die menschlichen IgM-Antikörper gegen VP1-VLP mittels eines indirekten ELISA mit einem monoklonalen Antikörper der Maus gegen menschliches IgM und mit Peroxidase als Konjugat für die Farbreaktion nachzuweisen. Bei diesem Verfahren wurde die zunächst recht einfache

Methode eines direkten ELISA mit einem indirekten Nachweisschritt eines Detektionsystems aus zwei Antikörpern kombiniert. Es wurde hierfür der Test nach ELGH (ELGH et al., 1995) durch das Detektionssystem nach WEE (WEE et al., 1992) modifiziert. Das bedeutet, dass innerhalb eines direkten ELISA die Detektion von spezifischem IgM durch einen monoklonalen Antikörper erfolgt, der wiederum über Peroxidase als Substrat nachgewiesen wird. Leider war ein solcher monoklonaler Antikörper, der mit Peroxidase konjugiert ist, nicht erhältlich. Das Substrat sollte aber Peroxidase sein, da der bereits beschriebene Versuch mit alkalischer Phosphatase als Substrat fehlgeschlagen war. So mussten zwei Antikörper kombiniert werden, um dieses Ziel zu erreichen. Dies wurde nun in Anlehnung an J.L.K. WEE et al. durchgeführt, die mit einem Detektionssystem aus zwei Antikörpern erfolgreich IgM-Antikörper gegen Antigene von Toxoplasma gondii durch einen capture-ELISA nachgewiesen hatten (WEE et al., 1992). Durch diese neuartige Methode erbrachten die im Radioimmunoassay durch W.KNOWLES positiv getesteten Patientenseren (KNOWLES et al., 1992) entsprechende Extinktionswerte in diesem indirekten ELISA-Verfahren. Das Serum, das im Radioimmunoassay die höchste Anzahl an Units erbrachte, zeigte auch in diesem ELISA den höchsten Extinktionswert (Nr. 81/11455). Dieses Serum wurde als Positivkontrolle und Referenzserum für die weiteren Messungen verwendet. Die Referenzkurven, die daraus wiederholt erstellt wurden, lagen in der Verdünnung 1:5000 immer im sicher positiven Bereich und zeigten mit steigendem Verdünnungsfaktor einen gleichmäßigen Abfall bis unter die Nachweisgrenze. Die Standardkurve zeigt in logarithmischer Darstellung einen linearen Abfall mit steigendem Verdünnungsfaktor (Abbildung 12). Die positiven Ergebnisse waren reproduzierbar und die Negativkontrolle, die der IgM-Standard darstellte, erbrachte negative Extinktionswerte, so dass falsch positive Ergebnisse sehr unwahrscheinlich waren. Die Hintergrundwerte, die sich an den Negativkontrollriegeln ablesen ließen, waren zwar immer noch relativ hoch, jedoch in ihrer Höhe deutlich abgegrenzt gegen die Extinktionswerte des positiven Serums. Gegen falsch positive Ergebnisse sprachen die Reproduzierbarkeit der Kurven und der gleichmäßige Abfall mit steigender Serumverdünnung. Es wurden

Kreuztitrationen durchgeführt, um eine Kreuzreaktivität der einzelnen Reagenzien untereinander oder mit der Platte unabhängig von der Anwesenheit von VP1-VLP zu prüfen. Sie erbrachten aber allesamt negative Werte, so dass von einer Spezifität dieses Tests für menschliche IgM-Antikörper gegen VP1-VLP ausgegangen werden kann. Mit diesem ELISA wurde eine Screening-Untersuchung von 383 Patienten auf IgM-Antikörper gegen VP1-VLP durchgeführt, deren Ergebnisse unter 4.4 näher erläutert werden.

4.4 Der indirekte ELISA mit einem Detektionssystem aus zwei Antikörpern zum Nachweis von IgM-Antikörpern gegen VP1-VLP

4.4.1 Bedeutung von Positiv- und Negativkontrolle sowie Aussagekraft der Referenzkurve

Ein wichtiger Bestandteil dieses Testverfahrens ist eine geeignete Positivkontrolle, die im Versuchsstadium den einzigen Anhalt für ein Gelingen des Versuchs darstellt. Für diese Arbeit wurden zehn Seren von W. KNOWLES zur Verfügung gestellt, die zuvor in London mittels eines Radioimmunoassays auf den Gehalt von VP1-VLP-spezifischem IgM getestet worden waren. Unter diesen Seren befanden sich positive Proben, von denen eine als Referenzserum für die folgenden Versuche ausgewählt wurde. Ohne Referenzseren wäre die Entwicklung dieses Tests nicht möglich gewesen. In allen Untersuchungen fand sich bei steigender Verdünnung des Referenzserums ein linearer Abfall der gemessenen OD. Um stärkere Schwankungen der OD-Werte des Referenzserums zu vermeiden, müssen die Zusammensetzung und/oder Lagerbedingungen des Referenzserums verbessert werden. Analog dem Vorgehen bei dem IgG ELISA (WEBER et al., 1997) kann ein Referenzserum aus mehreren Seren gepoolt werden, die IgM-VP1-VLP-spezifische Antikörper enthalten. Die Stabilität dieses Serums müßte in verschiedenen Puffern validiert werden. Die Lyophilisierung der Seren und anschließende Lagerung des reinen IgM in 20 mM TBS-Puffer mit 0,5M NaCl bei –20°C oder niedrigeren Temperaturen wäre eine mögliche Methode (STIESS, 2002).

Für jede Platte wurde aus dem positiven Referenzserum eine Referenzkurve erstellt, mit der es möglich war, die Extinktionswerte der Messungen der einzelnen Patientenseren im Bezug auf das Referenzserum einzuordnen. So wurde der Vergleich der Messungen auf unterschiedlichen Platten, zu verschiedenen Zeitpunkten und unter eventuell unterschiedlichen anderen äußeren Bedingungen ermöglicht. Mit der Festlegung einer unteren Nachweisgrenze, wie unter 4.4.2 beschrieben, (CUTLER et al., 1989; TREBST, 1995) wurde ermöglicht, dass die Werte, die als positiv definiert wurden, auch auf jeder der Platten reproduzierbar positiv gemessen werden konnten. Die Referenz- und Standardkurve ermöglicht den Vergleich der Extinktionswerte zwischen verschiedenden ELISA-Platten. Zusätzlich gestattet dieses Verfahren die Plausibilitätskontrolle aller eingesetzten Reagenzien.

Als Negativkontrolle für den Nachweis einer Bindung von unspezifischem IgM, diente ein IgM-Standard, der polyklonales menschliches IgM enthält (Sigma Aldrich, Deisenhofen). Es wurden immer zwei Näpfe pro Platte mit diesem polyklonalen IgM belegt. In dem erfolgreichen indirekten ELISA mit einem Detektionssystem aus zwei Antikörpern, wurde der Versuch als verwertbar betrachtet, wenn die Extinktion dieses Standards den Wert 0,1 nicht überschritt. Dieser Wert wurde willkürlich festgelegt und hat sich als guter Richtwert erwiesen. Wenn ein Extinktionswert von 0,1 für diese Kontrolle überschritten die Werte wurde. waren auch der Patientenmessungen meist ungewöhnlich hoch oder die Referenzkurve zeigte keinen gleichmäßigen Abfall mehr.

4.4.2 Die untere Nachweisgrenze

Die untere Nachweisgrenze ist diejenige Grenze, ab der eine Reaktion als positiv zu werten ist. Das bedeutet, oberhalb der unteren Nachweisgrenze sind in einer Serumprobe eindeutig Antikörper nachweisbar. Sie wird oberhalb einer von CUTLER und WRIGHT (1989) für den ELISA beschriebenen Grauzone festgelegt, bei der positive und negative Ergebnisse nicht mehr eindeutig zu differenzieren sind. Gewöhnlich errechnet sie sich aus einer Multiplikation der Standardabweichung addiert zum Mittelwert der Reaktion negativer Kontrollseren mit dem Antigen. Meist handelt es sich dabei um die zwei- bzw. dreifache Standardabweichung addiert zum Mittelwert (KLEIMAN et al., 1983; MÜLLER et al., 1987) Die Definition von Negativeeren war bei diesem Test sehr schwierig da er

Die Definition von Negativseren war bei diesem Test sehr schwierig, da er noch nicht standardisiert ist. Deshalb wurde, in Anlehnung an die Arbeit von C. TREBST (TREBST, 1995), die untere Nachweisgrenze auf folgende Weise festgelegt. Es wurden 383 Seren eines unausgewählten Kollektivs untersucht und die 8 Seren mit den geringsten Messwerten größer Null, als negativ definiert. Die Messung dieser Seren wurde noch zweimal wiederholt, so dass 24 relativ sicher negative Werte zur Verfügung standen. Aus diesen Werten wurde der Mittelwert und die Standardabweichung der gemessenen Extinktionen errechnet und die untere Nachweisgrenze als Mittelwert zuzüglich der fünffachen Standardabweichung festgelegt. Abbildung 7 stellt die 24 Werte, sowie den Mittelwert (0,103), die Standardabweichung (0,092) und die ermittelte untere Nachweisgrenze (0,563) dar. Die Patientenseren, die in der Screening-Untersuchung Extinktionswerte über dieser unteren Nachweisgrenze erbrachten, lagen auch bei zweimaliger Wiederholung des Tests mit Werten über 0,563 im positiven Bereich und somit erwiesen sich die Ergebnisse als reproduzierbar. In der Literatur wird die untere Nachweisgrenze für einen IgM-ELISA, wie oben genannt, meist bei dem Mittelwert sicher negativer Messwerte zuzüglich der zwei- (KLEIMAN et al., 1983) bzw. dreifachen (MÜLLER et al.; 1987, HO et al., 1989) Standardabweichung festgelegt. Bei diesem Testverfahren hätte der Mittelwert zuzüglich der zweifachen Standardabweichung 0,287 betragen. Bei dieser unteren Nachweisgrenze wären in der Screening-Untersuchung acht Seren in den positiven Bereich gefallen, deren Messwerte sich nicht in dieser Höhe reproduzieren ließen (Serum Nr. 1, 17, 19, 20, 21, 23, 24 und 37 (siehe 6.7)). Somit hätte man acht (8 von 383, 2,09%) falsch positive Ergebnisse erhalten. Bei der Festlegung der unteren Nachweisgrenze als Mittelwert zuzüglich der dreifachen Standardabweichung, die 0,379 betragen würde, hätte es sich ähnlich verhalten. Hierbei wären sechs Testergebnisse

(6 von 383, 1,57%) falsch positiv ausgefallen (Serum Nr. 1, 17, 21, 23, 24 und 37 (siehe 6.7)). Bei der letztlich festgelegten Nachweisgrenze von 0,563, die, in Anlehnung an die Arbeit von TREBST (1995), dem Mittelwert plus der fünffachen Standardabweichung entspricht, liegt keiner der 24 als negativ angenommenen Serumwerte im positiven Bereich und man erhält zwei falsch positive Werte aus den 383 Messungen der Screeninguntersuchung (2 von 383, 0,52%) (Serum Nr. 1 und 37 (siehe 6.7)), die sich nicht als positive Werte reproduzieren lassen.

Ein Hinweis auf falsch negative Werte ergibt sich nicht, da keiner der im Screening als negativ getesteten Werte innerhalb der Mehrfachmessungen in der zweiten oder dritten Messung einen positiven Messwert erbrachte. Damit ist die Möglichkeit falsch negativer Messwerte nicht ausgeschlossen, dürfte aber sehr unwahrscheinlich sein. Die Instabilität des IgM an sich kann natürlich ebenfalls eine Ursache von falsch negativ gemessenen Werten sein. In einem solchen Fall wird auch die mehrfache Wiederholung der Messung keine Änderung des negativen Messwertes erbringen. Es besteht ebenso die Möglichkeit von falsch positiven Messwerten. Diese könnten zum Beispiel durch das Vorhandensein von Rheumafaktoren erklärt sein, die ebenfalls der Immunglobulinklasse M angehören (BUKH et al., 1988). Auch unspezifisches oder gegen andere Antigene gerichtetes IgM könnte eine falsch positive Reaktion vortäuschen (MANIER-MONTREUIL et al., 1987). Gegen diese Annahme spricht jedoch vor allem die geringe Anzahl an positiven Ergebnissen und die fehlende Reaktivität mit dem eingesetzten IgM-Standard, so dass hierfür kein Anhalt besteht. Ebenso ist die Interferenz mit gegen VP1-VLP gerichtetem IgG nicht auszuschließen und muß als Fehlerquelle in Betracht gezogen werden (ELGH et al., 1995; KONISHI et al. 1996). Aber auch hierbei wäre eine weit größere Anzahl an positiven Seren zu erwarten gewesen, wenn man die hohe Durchseuchung der Bevölkerung mit gegen VP1-VLP gerichtetem IgG bedenkt.

Die Darstellung der Meßergebnisse als Box-Plot (Abb. 13) zeigt, dass positive und negative Messwerte sich, selbst unter Einschluß der Konfidenzintervalle, eindeutig unterscheiden lassen. Eine Grauzone, in der das Ergebnis nicht eindeutig als positiv oder negativ anzusehen ist, zeigt sich nicht.

4.4.3 Interpretation der Messergebnisse

Mittels dieses ELISA wurden vier von 383 Seren als positiv für den Gehalt an VP1-VLP-spezifischem IgM getestet. Das liefert zunächst den Hinweis, dass bei vier Personen (4 von 383, 1,04%) eine frische oder reaktivierte Infektion mit JC-Virus vorliegt. Da die vier Seren auch positiv für VP1-VLPspezifisches IgG waren, handelt es sich um eine reaktivierte Infektion. Dieses Immunglobulinmuster spricht für eine Infektion des Organismus mit einem schon bekannten Erreger im Sinne einer Sekundärreaktion, wobei der Zeitpunkt der Primärinfektion unbekannt ist (THOMAS et al., 1991). In diesem unausgewählten Normalkollektiv, entspricht dies einem Anteil von 1,04%, der eine frische oder reaktivierte Infektion mit JC-Virus aufweist. Wenn man die extrem hohe Durchseuchung der Bevölkerung mit VP1-VLPspezifischem IgG bedenkt, die bis zu 85% angegeben wird (siehe 1.1), erscheint diese Zahl durchaus plausibel. Für eine reaktivierte Infektion spricht das Alter der Patienten zwischen 26 und 65 Jahren, da die Erstinfektion eher im Kindes- und Jugendalter auftritt. Zwei der Patienten zeigen Erkrankungen der Harnwege (siehe Tab. 1), was unter dem Gesichtspunkt interessant ist, dass JCV nach der Primärinfektion in der Niere persistiert (ANDREWS et al., 1988). In weiteren Arbeiten sollte eine mögliche Assoziation von JCV mit akuten oder reaktivierten Infekten des Urogenitaltraktes untersucht werden. Es zeigen sich auch Parallelen zur BKV-Infektion, da dieses Virus ebenfalls in der Niere persistiert und Antikörper vom Typ des IgG und auch des IgM gehäuft bei Harnwegserkrankungen, in der Schwangerschaft und auch unter Immunsuppression nach z.B. Organtransplantation nachgewiesen werden können (FLAEGSTAD et al., 1985, ANDREWS et al., 1988). Die 26jährige Patientin K H befand sich in der 36. SSW und die 48jährige Patientin Z H erhielt eine Kortikoidtherapie. Somit sind insgesamt betrachtet bei allen vier Patienten, die einen positiven Messwert von IgM gegen VP1-VLP aufwiesen, bekannte Umstände für ein Auftreten von IgM-Antikörpern gegen humane Polyomaviren erfüllt. Dies spricht für die Richtigkeit der erhaltenen

Messwerte und für die Reliabilität des vorgestellten Tests. KNOWLES et al. geben eine Zahl von 15% eines Kollektivs von gesunden Blutspendern an, bei denen JCV-spezifisches IgM nachgewiesen wurde (KNOWLES et al., 1992). Dieser hohe Prozentsatz konnte mittels dieses ELISA nicht bestätigt werden. Es ist jedoch zu bedenken, dass von KNOWLES et al. ein MACRIA unter Einsatz von kompletten JC-Viren zum Nachweis diente. Das komplette Virus enthält neben VP1-VLP auch VP2 und VP3 (WALKER, 1985). Hierbei ist zudem unbekannt, wie viele Epitope des viralen Antigens unter in-vitro-Bedingungen linear und wie viele nativ bzw. räumlich vorliegen, da die Denaturierung von Proteinen mit Veränderungen der Konformation dieses Antigens einhergeht und so auch die räumliche Komplementarität von Epitop und Paratop, die für immunologischen Reaktionen von Bedeutung ist, verändern kann (ROITT, 1993). Dieser Prozess erklärt, warum sich im Western Blot keine Bindung des IgM an VP1-VLPs bzw. VP1 findet. Die konformationellen Epitope sind offensichtlich diejenigen, die von IgM erkannt werden, während IgG sowohl lineare Epitope als auch konformationelle Epitope erkennt (WEBER und MAJOR, 1997). Die Durchführung des MACRIA erfolgte außerdem als capture-ELISA unter Anwendung eines JCspezifischen monoklonalen Antikörpers, der ebenfalls gegen das komplette JC-Virus gerichtet ist und der Nachweis des gebundenen Antikörpers erfolgte mittels Radioaktivität (KNOWLES et al., 1992). In dem in dieser Arbeit VP1-VLP vorgestellten indirekten ELISA wird rekombinantes als hochspezifisches Antigen eingesetzt, was mit sich bringt, dass die Wahrscheinlichkeit von unspezifischen Bindungen verringert wird. Auch hierbei ist nichts über die Konformation des Proteins zum Zeitpunkt der Reaktion bekannt, aber es handelt sich um nur ein Strukturprotein des JC-Virus und somit sind die Möglichkeiten der Komformationsänderung begrenzt und es kann eine höhere Spezifität vermutet werden (GOLDMANN et al., 1999). Ein direkter Vergleich des MACRIA und des ELISA mit einem Detektionssystem aus zwei Antikörpern ist demzufolge nicht möglich.

Über die oben genannten Faktoren hinaus konnten z.B. bezüglich des Alters, der Diagnosen oder anderer Merkmale keine direkten Parallelen bei den vier im ELISA positiv getesteten Personen gezogen werden (siehe Tabelle 1), so dass sich, abgesehen von den bekannten Faktoren, kein weiterer Hinweis auf die möglichen Symptome einer Primärinfektion oder die Bedingungen, unter denen eine Reaktivierung der Infektion auftritt, ergeben. Mit Hilfe dieses ELISA wäre es, nach weiterer Optimierung, jedoch möglich, bei PML-Patienten eine Titerbestimmung für VP1-VLP-spezifisches IgM vorzunehmen, um zwischen einer zurückliegenden Infektion, bei der nur IgG nachzuweisen wäre, und einer frischen bzw. reaktivierten Infektion durch den Nachweis von IgM-Antikörpern zu unterscheiden. Unter Umständen könnten sich hieraus in Zukunft therapeutische oder auch prognostische Unterschiede ergeben.

4.5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot

Als zweites Verfahren zur Spezifitätskontrolle des ELISA wurden eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese und ein Western-Blot durchgeführt. Die Patientenseren zeigten im Western-Blot keine spezifische Reaktivität gegen das rekombinante VP1-VLP. Im Bereich von 42 kD, der Größe von VP1-VLP, zeigte sich keine Farbreaktion. Bei sechs Seren zeigte sich eine schwache Farbreaktion bei ca. 80 kD. Es könnte sich dabei um eine Reaktion mit Dimeren des VP1-VLP handeln, die aufgrund unvollständiger Denaturierung der VP1-VLPs mit SDS entstanden sind (GUIRAKHOO, 1990). Im Fall einer kompletten Denaturierung sind eher keine erkennbaren Banden zu erwarten. Die Aufspaltung der Disulfidbrücken durch die Zugabe von β -N-Mercaptoethanol hat wahrscheinlich eine Konformationsänderung der VP1-VLP-Moleküle zur Folge (ZEECK, 1992). Hierdurch könnten die Epitope des Antigens linear entfaltet und nicht mehr konformationell vorliegen, wodurch die Antikörper-Antigen-Erkennung verhindert werden kann. Unter der Vorstellung der räumlichen Komplementarität von Epitop und Paratop kann unter diesen Bedingungen die gewünschte Reaktion nicht mehr stattfinden (ROITT, 1993). Die Durchführung eines Western-Blots zum Nachweis von IgM-Antikörpern gestaltet sich somit als sehr schwierig und ist in dieser Arbeit nicht gelungen.

4.6 Ausblick auf das Screening ausgewählter Patientenkollektive

Um die Sensitivität und die Spezifität des vorgestellten ELISA zu prüfen, sind sicher noch etliche Arbeitsschritte erforderlich. Als nächster Schritt steht die Durchführung von Screeninguntersuchungen an ausgewählten Patientenkollektiven an. Hierbei sollte zunächst ein Kollektiv ausgewählt werden, bei dem die Wahrscheinlichkeit des Vorliegens von IgM-Antikörpern gegen VP1-VLP relativ hoch ist, und im Gegensatz dazu ein Kontrollgruppe, bei der man kein Vorliegen der betreffenden Antikörper vermutet. Zu der ersten Gruppe gehören nach der vorliegenden Literatur Schwangere, Immunsupprimierte, Patienten mit Harnwegserkrankungen und Patienten mit Z.n. Nieren oder Knochenmarkstransplantation (ANDREWS et al., 1988; FLAEGSTAD et al., 1985). Analog der Bestimmung von VP1-spezifischem IgG sollte in einer solchen Untersuchung ein guantitativer ELISA eingesetzt werden, der unter Bezugnahme auf willkürliche Einheiten der Referenzkurve zwischen 0 und 100 eine vergleichende Bestimmung von VP1-spezifischem IgM gestattet (WEBER et al., 1997).

5 Zusammenfassung

Die PML ist eine demyelisierende Erkrankung des ZNS, von der vorwiegend immunsupprimierte Patienten betroffen sind und die in der heutigen Zeit hauptsächlich bei HIV infizierten Patienten beobachtet wird. Als ätiologisches Agens ist das JC-Virus nachgewiesen. VP1 ist das Hauptstrukturprotein des JC-Virus und wird unter anderem in immunologischen Tests zum Nachweis von Antikörpern eingesetzt. In dieser Arbeit wird ein neuer ELISA zum serologischen Nachweis von VP1-VLP (virus-like-particle)-spezifischem IgM vorgestellt. Es handelt sich um einen indirekten ELISA, in dem ein Detektionssystem aus zwei Antikörpern und Peroxidase als Substrat für die Farbreaktion verwendet wird. Ein unausgewähltes Normalkollektiv von 383 Personen wurde mittels dieses ELISA auf IgM-Antikörper, die gegen VP1-VLP gerichtet sind, untersucht. Bei vier von 383 Personen war VP1-VLPspezifisches IgM nachzuweisen, was einem Prozentsatz von 1,04 % entspricht. Es steht mit diesem ELISA eine neue Methode zum einfachen und schnellen serologischen Nachweis von VP1-VLP-spezifischem IgM zur Verfügung, die nach weiterer Optimierung dazu dienen kann, eine frische Infektion mit JC-Virus oder die Reaktivierung einer früheren Infektion nachzuweisen und somit zur Klärung der Primärinfektion mit JC-Virus, sowie der Erweiterung des Wissens über die Pathogenese und Ätiologie der PML beizutragen.

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

AIDS	Aquired immunodeficiency syndrome		
AK	Antikörper		
APS	Ammoniumpersulfat		
ASI	Antikörper-Spezifitäts-Index		
BKV	BK-Virus		
BLOTTO	Bovine lacto transfer technic optimizer		
bzw.	beziehungsweise		
°C	Grad Celsius		
Ca	Carcinom		
CART	Combined antiretroviral therapy		
CDC-	Centers for disease control-Classification		
Klassifikation			
ст	Zentimeter		
const.	constant		
dOD	Differenz der optischen Dichte		
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay		
et al.	und andere		
h	Stunde		
H ₂ O	Wasser		
HAART	Highly active antiretroviral therapy		
HCI	Salzsäure		
HI	Haemagglutination-inhibition-test,		
	Hämagglutinationshemmtest		
HIV	Human immunodeficiency virus		
HMPAO	Hexamethylpropylenaminoxim		
lgG	Immunglobulin der Klasse G		
lgM	Immunglobulin der Klasse M		

ILMT	Institut	für	Laboratoriumsmedizin	und
	Transfusions	medizin		
JCV	JC-Virus			
kDa	Kilodalton			
log	Logarithmus			
μg	Mikrogramm			
μΙ	Mikroliter			
μm	Mikrometer			
т	männlich			
mA	MilliAmpere			
MACRIA	M-antibody-c	apture rac	lioimmunoassay	
min	Minute			
ml	Milliliter			
mm	Millimeter			
mmol	milliMol			
MRI	Magnet resor	nance ima	ging	
MW	molecular we	eight, Mole	kulargewicht	
Ν	Normal			
NaCl	Natriumchlor	id		
NaOH	Natronlauge			
ng	Nanogramm			
Nr.	Nummer			
Pat.	Patient/-in			
PBS	Phosphate b	uffered sa	ine	
PBS	Phosphate b	uffered sa	ine	
PCR	Polymerase of	chain reac	tion	
PML	Progressive i	multifokale	Leukoenzephalopathie	
pNPP	p-Nitropheno	I-Phospha	t	
SDS	Dodecylsulfa	t Natriums	alz	
Sf	Spodoptera f	rugiperda		
SPECT	Single-Photo	n-Emissio	nstomographie	
SSW	Schwangerso	chaftswocł	ne	

SV 40	Simian virus 40
TEMED	N, N, N´,-N´-Tetramethylethyldiamin
ТМВ	3,3´,5,5´-Tetramethylbenzidine
V	Volt
V.a.	Verdacht auf
<i>v/v</i>	volume per volume
VLP	Virus-like particle
VP 1	Virusprotein 1
W	weiblich
w/v	weight per volume
z.B.	zum Beispiel
Z.n.	Zustand nach

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des ELISA zum Nachweis von IgG-
Antikörpern gegen VP1-VLP12
Abbildung 2: Schematische Darstellung des direkten ELISA mit einem
polyklonalen Peroxidase-konjugierten Detektionsantikörper
Abbildung 3: Schematische Darstellung des direkten ELISA mit einem
Alkalische-Phosphatase-konjugierten Detektionsantikörper
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Capture-ELISA mit einem
polyklonalen Beschichtungsantikörper18
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Capture-ELISA mit einem
monoklonalen Beschichtungsantikörper19
Abbildung 6: Schematische Darstellung des indirekten ELISA mit einem
Detektionssystem aus zwei Antikörpern zum Nachweis von VP1-VLP-
spezifischem IgM20
Abbildung 7: Darstellung der Extinktionen der 24 negativen Messwerte zur
Ermittlung der unteren Nachweisgrenze22
Abbildung 8: Standardkurven der fünf getesteten ELISA-Platten
Abbildung 9: Standardkurven der Platten 475078 und 445101 im direkten
Vergleich27
Abbildung 10: Referenzkurve (Serum Nr. 81/11455) im direkten ELISA mit
einem monoklonalen alkalische Phosphatase-konjugierten
Detektionsantikörper28
Abbildung 11: Verdünnungskurven von sechs im Radioimmunoassay
vorgetesteten Seren im indirekten ELISA mit einem Detektionssystem
aus zwei Antikörpern
Abbildung 12: Standardkurve des Referenzserums, über 16 Versuche
gemittelt
Abbildung 13: Darstellung der Patientenmessungen als Box-Plot

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Positive Patientenseren	.32
Tabelle 2: Ergebnisse des Tests auf VP1-VLP-spezifische IgG-Antikörper	.34
Tabelle 3: Humanes Referenzserum für die Auswahl der Platten	.58
Tabelle 4: Humanes Referenzserum für den IgM-ELISA	.59
Tabelle 5: Patientenliste des IgM-Screenings	.60

6.4 Puffer

Die Puffer sind in alphabetischer Reihenfolge aufgeführt.

6.4.1 ELISA

Beschichtungspuffer	15 mM Na ₂ CO ₃ , 35 mM NaHCO ₃ , 3 mM NaN ₃			
	(alles Merck, Darmstadt), pH 9,6			
BLOTTO	bovine lacto transfer technic optimizer; 5% [w/v]			
	fettfreie Trockenmilch (Töpfer			
	GmbH,Dietmannsried), 0,2% [v/v] TWEEN 20			
	(Merck, Darmstadt) angesetzt in PBS			
Carbonat-Puffer	100 mM Natriumhydrogencarbonat (Merck,			
	Darmstadt), 1 mM Magnesiumchlorid (Merck,			
	Darmstadt), pH 9,8			
Citrat-Puffer	0,1 M Zitronensäure-Monohydrat (Merck,			
	Darmstadt), pH 5,5 (eingestellt mit 1 M NaOH)			
PBS	<u>p</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline; 3 mM			
	Kaliumdihydrogenphsphat, 17 mM di-			
	Natriumhydrogenphosphat, 120 mM Natriumchlorid			
	(alles Merck, Darmstadt), pH 7,2			
PBS-Waschpuffer	PBS + 0,05% [v/v] TWEEN 20			
TBS	tris <u>b</u> uffered <u>s</u> aline; 20 mM Tris (Sigma-Aldrich,			
	Deisenhofen), 500 mM NaCl (Merck, Darmstadt),			
	рН 7,5			
TBS-Waschpuffer	TBS + 0,05% [v/v] TWEEN 20			

6.4.2 Western Blot

Carbonat-Puffer	100 mM Natriumhydrogencarbonat (Merck,	
	Darmstadt), 1mM Magnesiumchlorid (Merck,	
	Darmstadt),pH 9,8	
Lauf-Puffer	0,9 g Tris-base (Sigma-Aldrich, Deisenhofen),	
	4,32 g Glycine (BioRad, München), 0,6 ml 10 %	
	SDS auf 300 ml H ₂ O	
Natriumacetat-Puffer	0,272 % Natrium-Acetat, 0,9 % Eisessig (beides	
	Merck, Darmstadt) auf 1 Liter H ₂ O	
	(Aqua ad iniectabilia; Braun, Melsungen)	
Proben-Puffer $3,8$ ml H ₂ O, 1 ml 0,5 M Tris-Cl pH 6,8,		
	Glycerol (Merck, Darmstadt), 1,6 ml	
	10 % SDS (<u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate, Dodecylsulfat	
	Natriumsalz; Merck, Darmstadt), 0,4 ml 0,5 % [w/v]	
Bromphenol blau (Merck, Darmstadt),		
	0,4 ml Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich,	
	Deisenhofen)	
Transfer-Puffer	20 mM Natriumdihydrogenphosphat, 20 mM Di-	
	Natriumhydrogenphosphat, 20% [v/v] Methanol	
	(alles Merck, Darmstadt), 0,02% [w/v] SDS	

6.5 Humanes Referenzserum für die Auswahl der Platten

Es wurden sieben Patienten ausgewählt, die im Rahmen der Dissertation von C. TREBST (TREBST, 1995) im ELISA auf IgG-Antikörper gegen VP1-VLP getestet wurden und ein positives Ergebnis erbrachten. Es handelte sich dabei um Patienten mit verschiedenen neurologischen Krankheitsbildern, die der untenstehenden Tabelle entnommen werden können.

Außerdem wurde ein Patient ausgewählt, bei dem in dem Neurochemischen Labor des Marienkrankenhauses in Hamburg die Verdachtsdiagnose PML bestätigt werden konnte und der im ELISA einen hohen Titer an anti-VP1-VLP-IgG aufwies.

Name	Alter	Geschlecht	VP1-VLP-	Krankheitsbild
			ASI	
AS	27	w	2,49	ED
СМ	29	W	0,55	ED
КJ	46	m	3,9	PML
NR	41	m	107	PML
R Wo	51	m	1,36	Polyneuropathie
				bei Diab. Mell.
Sp H	41	m	0,87	Virale Meningitis
T K-R	43	m	0,81	PML
B Th	36	m	4,2	V.a. PML

Tabelle 3: Humanes	Referenzserum	für	die Auswahl	der	Platten
---------------------------	---------------	-----	-------------	-----	---------

Erläuterungen:

w = weiblich;m = männlich;ASI = Antikörper-Spezifitäts-Index;ED = Encephalomyelitisdisseminata;PML = progressivemultifokaleLeukoenzephalopathie;Diab.Mell. = Diabetes mellitus;V. a. = Verdacht auf

6.6 Humanes Referenzserum für den IgM-ELISA

Liste der menschlichen Seren, die im Radioimmunoassay auf IgM gegen JCund BK-Virus getestet wurden.

Die Messungen wurden am 2.6.1998 in England durchgeführt.

Patienten-Nummer	IgM-Titer JC-Virus	IgM-Titer BK-Virus
79/7076	11 units	56 units
80/933c	31 units	5,8 units
80/935b	18 units	<0,3 units
80/9380	31 units	7,8 units
80/11296b	5,7 units	<0,3 units
80/13208	26 units	55 units
80/15077	11 units	27 units
81/2581	<1 units	1,8 units
81/2819	<1 units	<1 units
81/11455	>90 units	~4 units

Tabelle 4: Humanes Referenzserum für den IgM-ELISA

6.7 Patientenliste des IgM-Screenings

Die folgenden 38 Seren erzielten in der ersten Messung die höchsten Messwerte im ELISA zum Nachweis von IgM gegen VP1-VLP. Daraufhin wurde die Messung zweimal wiederholt, um die Reproduzierbarkeit des Ergebnisses zu überprüfen. Die Messwerte sind in delta OD (Differenz der optischen Dichte) angegeben.

Nr.	Initialen der	Alter in	Geschlecht	1.	2.	3.
	Patienten	Jahren		Meßergebnis	Meßergebnis	Meßergebnis
1	ВС	23	m	0,84	0,012	0,033
2	ВG	58	w	0,12	0,086	0,051
3	BI	57	w	0,154	0,025	0,046
4	BR	26	m	0,252	0,001	0,038
5	CF	88	w	0,118	0,133	0,080
6	СР	41	m	0,221	0,068	0,120
7	CR	65	m	1,949	1,285	1,158
8	DE	83	w	0,36	0,048	0,115
9	D-O A	21	w	0,264	0,083	0,050
10	FВ	29	w	0,143	0,077	0,210
11	FE	69	w	0,177	0,155	0,164
12	FΜ	66	w	0,228	0,076	0,246
13	G M	49	w	0,214	0,187	0,104
14	нн	39	m	0,125	0,327	0,156
15	HR	53	w	0,216	0,111	0,174
16	КН	26	m	0,791	0,681	0,791
17	КН	78	w	0,386	0,211	0,200
18	K J-C	1	m	0,201	0,072	0,081
19	LE	68	m	0,298	0,216	0,105
20	LM	56	w	0,326	0,218	0,301
21	NK	30	m	0,527	0,082	0,152

Tabelle 5: Patientenliste des IgM-Screenings

22	O M-G-W	17	m	0,134	0,078	0,096
23	РG	61	w	0,503	0,205	0,537
24	R H-J	57	m	0,391	0,132	0,164
25	RI	75	w	0,126	0,087	0,014
26	RU	82	w	0,125	0,078	0,133
27	S A	40	m	0,222	0,078	0,104
28	S H-J	72	m	0,107	0,045	0,098
29	ST	55	w	0,116	0,003	0,132
30	ТН	20	w	0,217	0,101	0,041
31	VК	84	w	0,11	0,121	0,191
32	W M	76	w	0,16	0,163	0,311
33	WS	55	m	1,129	1,229	1,102
34	Y G	20	w	0,233	0,222	0,395
35	ZA	28	w	0,178	0,003	0,026
36	ZH	48	w	0,495	1,206	1,034
37	UZ/1022	57	m	0,596	0,109	0,243
38	UZ/1106	54	w	0,267	0,253	0,291

Erläuterungen: Nr. = Nummer; m = männlich; w = weiblich

6.8 Literaturverzeichnis

- Aksamit AJ, Major EO, Ghatak NR, Sidhu GS, Parisi JE, Guccion JG (1987): Diagnosis of Progressive Multifocal Leukoencephalopathy by Brain Biopsy with Biotin Labeled DNA: DNA in situ Hydridization. J Neuropathol Exp Neurol <u>46</u>, 556-566
- Aksamit AJ, Gendelman HE, Orenstein JM, Pezeshkpour GH (1990):AIDSassociated progressive multifocal leukoencephalopathy (PML): Comparison to non-AIDS-PML with in situ hybridization and immunohistochemistry. Neurology <u>40</u>, 1073-1078
- Alafuzoff I, Hartikainen P, Hanninen T, Partanen K, Kuikka J, Syrjanen K, Naukkarinen A, Soininen H (1999): Rapidly progressive multifocal leukoencephalopathy with substantial cell-mediated inflammatory response and with cognitive decline of non-Alzheimer type in a 75-yearold female patient. Clin Neuropathol. 1999 May-Jun; <u>18</u>(3):113-23.
- Albrecht H, Hoffmann C, Degen O, Stoehr A, Plettenberg A, Mertenskotter T, Eggers C, Stellbrink HJ (1998): Highly active antiretroviral therapy significantly improves the prognosis of patients with HIV-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. AIDS <u>12</u> (10), 1149-1154
- Albrecht H, Hoffmann C, Degen O, Stoehr A, Plettenberg A, Mertenskotter T, Eggers C, Stellbrink HJ (1998): Highly active antiretroviral therapy significantly improves the prognosis of patients with HIV-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. Aids 12, 1149-54
- Ammassari A, Cingolani A, Pezzotti P, De Luca DA, Murri R, Giancola ML, Larocca LM, Antinori A (2000): AIDS-related focal brain lesions in the era of highly active antiretroviral therapy [In Process Citation]. Neurology <u>55</u>, 1194-200

- Andrews CA, Shah KV, Daniel RW, Hirsch MS, Rubin RH (1988): A serologocal investigation of BK Virus and JC Virus infections in recipients of renal allografts. J Infect Diseases 1988 Jul 158 (1); 176-181
- Antinori A, Ammassari A, De Luca A, Cingolani A, Murri R, Scoppettuolo G, Fortini M, Tartaglione T, Larocca LM, Zannoni G, Cattani P, Grillo R, Roselli R, Iacoangeli M, Scerrati M, Ortona L (1997): Diagnosis of AIDS-related focal brain lesions: A decision-making analysis based on clinical and neuroradiologic characteristics combined with polymerase chain reaction assays in CSF. Neurology <u>48</u>, 687-94
- Antinori A, Ammassari A, Giancola ML, Cingolani A, Grisetti S, Murri R,
 Alba L, Ciancio B, Soldani F, Larussa D, Ippolito G, De Luca A (2001):
 Epidemiology and prognosis of AIDS-associated progressive multifocal
 leukoencephalopathy in the HAART era. J Neurovirol 7, 323-8.
- Arribas JR, Arrizabalaga J, Mallolas J, Lopez-Cortes LF (1998):Advances in the diagnosis and treatment of infectious caused by herpesvirus and JC virus. Enferm Infec Microbiol Clin <u>16</u> (suppl 1), 11-19
- Arthur RR, Beckmann AM, Li CC, Saral R, Shah KV (1985): Direct detection of the human Papovavirus BK in urine of bone marrow transplant recipients: Comparison of DNA Hybridization with ELISA. J Med Virol <u>16</u>, 29-36
- Arthur RR, Shah KV (1998): Papovaviridae: The Polyomaviruses; in: Laboratory diagnosis of infectious diseases. Principles and practice, vol.
 II; hrsg. V. Balows A, Hausler WJ, Lenette EH; Springer Verlag, New York; 1988, 317-332

- Arthur RR, Shah KV, Yolken RH, Charache P: Detection of human papovavirus BKV and JCV in urines by ELISA; in: Polyomaviruses and human neurological diseases; hrsg. v. Sever JL, Madden D; Alan R. Liss, Inc., New York 1983, 169-176
- Aström K-E, Mancall EL, Richardson EP (1958): Progressive multifocal leukoencephalopathy: A Hitherot Unrecognized Complication of Chronic Lymphatic Leukaemia and Hodgkin's Disease. Brain <u>81</u>, 93-111
- Bacellar H, Munoz A, Miller EN, Cohen BA, Besley D., Selnes OA, Becker JT, McArthur JC (1994): Temporal trends in the incidence of HIV-1related neurologic diseases: Multicenter AIDS cohort study, 1985-1992. Neurology <u>44</u>, 1892-1900
- Bauer W, Chamberlin W, Horenstein S, (1969): Spinal Demyelination in Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. Neurology <u>19</u>, 287
- Berger JR (2000): Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. Curr Treat Options Neurol 2, 361-368.
- Berger JR, Concha M (1995):Progressive Multifocal Leukoencephalopathy: the evolution of a disease once considered rare. J Neuro Virol <u>1</u>, 5-18
- Berger JR, Kaszovitz B, Post MJ, Dickinson G (1987 a): Progressive Multifocal Leukoencephalopathy associated with Human Immunodeficiency Virus Infection. A Review of the Literature with Report of Sixteen Cases. Ann Intern Med <u>107</u>, 78-87
- Berger JR, Levy RM, Flomenhoft D, Dobbs M (1998): Predictive factors for prolonged survival in acquired immunodeficiency syndrome-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. Ann Neurol <u>44</u> (3), 341-349

- Berger JR, Major EO (1999): Progressive multifocal leukoencephalopathy. Semin Neurol. 1999;19(2):193-200
- Berger JR, Moskowitz L, Fischl M, Kelley RE (1987 b): Neurologic Disease as the presenting manifestation of acquired immunodeficiency syndrome. South Med J <u>80</u>, 683-686
- Berger JR, Mucke L (1988): Prolonged survival and partial recovery in AIDS-associated Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. Neurology <u>38</u>, 1060-1065
- Berger JR, Pall L, McArthur J, Hall C, Cimoch P, Evans B, Price R, Feraru
 E (1992): A pilot study of recombinant alpha 2a interferon in the treatment of AIDS-related progressive multifocal leukoencephalopathy. Neurology 42 (Suppl 3), 257
- Berger JR, Scott G, Albrecht J, Belman AL, Tornatore C, Major EO (1992): Progressive Multifocal Leukoencephalopathy in HIV-infected children. AIDS <u>6</u>, 837-841
- Blake K, Pillay, Knowles W, Brown DWG, Griffiths PD, Taylor B (1992): JC virus-associated meningoencephalitis in an immunocompetent girl. Arch Dis Child <u>67</u>, 956-957
- Bosch EP, Cancill PA, Cornell SH (1976): Computerized tomography in progressive multifocal leukoencephalopathy. Arch Neurol <u>33</u>, 216
- Bowler JV, Davies PT, Perkin GD (1992): 99Tcm-HMPAO-SPECT in progressive multifocal leukoencephalopathy. Br J Radiol <u>65</u> (773): 447-449
- Brooks BR, Walker DL (1984): Progressive multifocal leukoencephalopathy. Neurol Clin <u>2 (</u>2), 299-313
- Bukh A, Thomson BS, Kimose H-H et al. (1988): A Polyclonal IgM-RF Enzyme-Linked Immunosorbent Assay For The Detection Of Circulating Immune Complexes. J Clin Lab Immunol 1988, <u>26</u>, 195-200
- Cavanagh JB, Greenbaum D, Marshall AHE, Rubinstein LJ (1959): Cerebral demyelination associated with disorders of the reticuloendothelial system. Lancet <u>ii</u>, 524-529
- Chang, L, Ernst T, Tornatore C, Aronow H, Melchor R et al. (1997): Metabolite abnormalities in progressive multifocal leukoencephalopathy by proton magnetic resonance spectroscopy. Neurology 1997 Apr; <u>48</u> (4): 836-845
- Chappell ET, Guthrie BL, Orenstein J. (1992): The role of the stereotactic biopsy in the management of HIV-related focal lesions. Neurosurgery <u>30</u>, 825-829
- Ciricillo SF, Rosenblum ML (1990): Use of CT and MNR imaging to distinguish intracranial lesions and to define the need for biopsy in AIDS patients. J Neurosurg <u>73</u>, 720-724
- Clifford DB, Yiannoutsos C, Glicksman M, Simpson DM, Singer EJ, Piliero PJ, Marra CM, Francis GS, McArthur JC, Tyler KL, Tselis AC, Hyslop NE (1999): HAART improves prognosis in HIV-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. Neurology <u>52</u> (3), 623-625

- Clifford DB, Yiannoutsos C, Glicksman M, Simpson DM, Singer EJ, Piliero PJ, Marra CM, Francis GS, McArthur JC, Tyler KL, Tselis AC, Hyslop NE (1999): HAART improves prognosis in HIV-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. Neurology 52, 623-5
- Conomy JP, Weinstein MA, Agamanolis D, Holt WS (1976): Computed tomography in progressive multifocal leukoencephalopathy. Am J Roentgenol <u>127</u>, 663-665
- Cutler SJ, Wright DJ (1989): Comparison of immunofluorescence and enzyme linked immunosorbent assays for diagnosing Lyme disease. J Clin Pathol <u>42</u>, 869-871
- Daniel R, Shah K, Madden D, Stagno S (1981): Serological investigation of the possibility of congenital transmisssion of papovavirus JC. Infect Immun <u>33</u> (1), 319-321
- De Luca A, Giancola ML, Ammassari A et al. (2001): Potent anti-retroviral therapy without cidifovir for AIDS-associated progressive multifocal leukoencephalopathy: extended follow-up of an observational study. J Neurovirol 2001 Aug; <u>7</u> (4): 364-368
- De Luca A, Giancola ML, Ammassari A, Grisetti S, Cingolani A, Larussa D, Alba L, Murri R, Ippolito G, Cauda R, Monforte A, Antinori A (2001): Potent anti-retroviral therapy with or without cidofovir for AIDS associated progressive multifocal leukoencephalopathy: Extended follow- up of an observational study. J Neurovirol 7, 364-8.
- De Stefano N, Federico A, Arnold DL (1997): Proton magnetic resonance spectroscopy in brain white matter disorders. Ital J Neurol. Sci 1997 Dec; <u>18</u> (6): 331-339

- Domingo P, Guardiola JM, Iranzo A, Margall N (1997): Remission of progressive multifocal leukoencephalopathy after antiretroviral therapy. Lancet <u>349</u> (9064), 1554-1555
- Dupuis M, Fernandes Xavier FG, Gonsette RE, Brucher JM (1986): Leucoencéphalopathie multifocale progressive mimant une sclérose en plaques comme seule expression clinique d'un syndrome d'immunodéficience acquise. Acta Neurol Belg <u>86</u>, 285-296
- Elgh F, Wadell G, Juto P (1995): Comparison of the kinetics of Puumala virus specific IgM and IgG antibody responses in nephropathia epidemica as measured by a recombinant antigen-based enzyme-linked immunosorbent assay and an immunofluorescence test. J Med Virol. 1995 Feb;<u>45</u>(2):146-50.
- Feiden W, Bise K, Steude U, Pfister HW, Moller AA (1993): The stereotactic biopsy diagnosis of focal intracerebral lesions in AIDS patients. Acta Neurol Scand. 1993 Mar;<u>87(3)</u>:228-33.
- Fenner F (1976): The classification and nomenclature of viruses. Summary of results of meetings of the international committee on taxonomy of viruses in madrid, Intervirology Sept. 1975, <u>6</u>, 1-12
- Flaegstad T, Traavik T (1985): Detection of BK Virus IgM Antibodies by Two
 Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) and a
 Haemagglutination Inhibition Method. J Med Virol 1985 <u>17</u>; 195-204
- Frisque RJ, Bream GL, Cannella MT (1984): Human polyomavirus JC virus genome. J Virol 51, 458-69

- Frye S, Trebst C, Dittmer U, Petry H, Bodemer M, Hunsmann G, Weber T, Luke W (1997): Efficient production of JC virus in SVG cells and the use of purified viral antigens for analysis of specific humoral and cellular immune response. J Virol Methods. 1997 Jan <u>63 (1-2):81-92</u>.
- Gasnault J, Kousignian P, Kahraman M, Rahoiljaon J, Matheron S, Delfraissy JF, Taoufik Y (2001): Cidofovir in AIDS-associated progressive multifocal leukoencephalopathy: A monocenter observational study with clinical and virus load monitoring. J Neurovirol 2001 Aug; 7 (4): 375-81
- Gasnault J, Taoufik Y, Goujard C, Kousignian P, Abbed K, Boue F, Dussaix E, Delfraissy JF (1999): Prolonged survival without neurological improvement in patients with AIDS-related progressive multifocal leukoencephalopathy on potent combined antiretroviral therapy. J Neurovirol 1999 Aug; <u>5</u>(4): 421-9.
- Gerber MA. Shah KV, Thung SN. ZU RHEIN GM (1980): Immunohistochemical demonstration of common antigen of polyomaviruses in routine histologic tissue sections of animals and man. Am J Clin Pathol 73, 794-797
- Geschwind M, Skolasky R, Royal W, McArthur J (2001): The relative contributions of HAART and alpha-interferon for therapy of progressive multifocal leukoencephalopathy in AIDS. J Neurovirol 7, 353-7.
- Gibson PE, Field AM, Gardner SD, Coleman DV (1981): Occurrence of IgM antibodies against BK and JC polyomaviruses during pregnancy. J Clin Pathol <u>34</u> (6), 674-679

- Gibson PE, Knowles WA, Hand JF, Brown DWG (1993): Detection of JC virus DNA in the cerebrospinal fluid of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. J Med Virol <u>39</u>, 278-281
- Gildenberg PL, Gathe Jr JC, Kim JH (2000): Stereotactic Biopsy of Cerebral Lesions in AIDS. Clin Infect Dis 30, 491-499
- Giudici B, Vaz B, Bossolasco S, Casari S, Brambilla AM, Luke W, Lazzarin A, Weber T, Cinque P (2000): Highly active antiretroviral therapy and progressive multifocal leukoencephalopathy: effects on cerebrospinal fluid markers of JC virus replication and immune response. Clin Infect Dis. 2000 Jan;30(1): 95-9.2000
- Giudici B, Vaz B, Bossolasco S, Casari S, Brambilla AM, Luke W, Lazzarin A, Weber T, Cinque P (2000): Highly active antiretroviral therapy and progressive multifocal leukoencephalopathy: effects on cerebrospinal fluid markers of JC virus replication and immune response. Clin Infect Dis 30, 95-9
- Goldmann C, Petry H, Frye S, Ast O, Ebitsch S, Jentsch KD, Kaup FJ, Weber F, Trebst C, Nisslein T, Hunsmann G, Weber T, Luke W (1999): Molecular cloning and expression of major structural protein VP1 of the human polyomavirus JC virus: formation of virus-like particles useful for immunological and therapeutic studies. J Virol. 1999 May;73(5):4465-9.
- Greenlee JE (1998): Progressive multifocal leukoencephalopathy progress made and lessons relearned. N Engl J Med <u>338</u> (19), 1378-1380
- Greenlee JE, Keeney PM (1986): Immunoenzymatic labelling of JC papovavirus T antigen in brains of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. Acta Neuropathol (Berl) <u>71</u>, 150-153

- Guilleux MH, Steiner RE, Young IR (1986): MR imaging in progressive multifocal leukoencephalopathy. AJNR <u>7</u>, 1033-1035
- Guirakhoo F, Heinz FX, Dippe H, Kunz C (1990): Antibody Response to gp
 E of Tick-Borne Encephalitis Virus: Comparison between Natural
 Infection and Vaccination Breakdown. Zbl. Bakt. 1990 <u>272</u>; 477-484
- Hall CD, Dafni U Simpson D, Clifford D, Wetherill PE, Cohen B, Mc Arthur J, Hollander H, Yainnoutsos C, Major E, Millar L, Timpone J (1998):
 Failure of cytarabine in progressive multifocal leukoencephalopathy associated with human immunodeficiency virus infection. AIDS Clinical Trials Group 243 Team. N Engl J Med <u>338</u>(19), 1345-1351
- Happe S, Besselmann M, Matheja P, Rickert CH, Schuierer G, Reichelt D, Husstedt IW (1999): [Cidofovir (vistide) in therapy of progressive multifocal leukoencephalopathy in AIDS. Review of the literature and report of 2 cases]. Nervenarzt. 1999 Oct; <u>70</u>(10):935-43.
- Hedley-White ET, Smith BP, Tyler HT, Peterson WP (1966): Multifocal Leukoencephalopathy With Remission And Five Year Survival. J Neuropathol Exp Neurol <u>25</u>, 107-116
- Heide W, Kömpf D, Reusche E, Bodemer M, Weber T (1995): Failure of cytarabine/interferon therapy in progressive multifocal leukoencephalopathy [letter]. Ann-Neurol 37, 412-3 issn: 0364-5134
- Ho DWT, Field PR, Cunningham AL (1989): Rapid diagnosis of acute Epstein-Barr virus infection by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for specific immunoglobulin M (IgM) antibody without rheumatoid factor and specific IgG interference. J Clin Microbiol 1989 <u>27(5)</u>, 952-958

- Holman RC, Janssen RS, Buehler JW, Zelasky MT, Hooper WC (1991): Epidemiology of progressive multifocal leukoencephalopathy. Ann Neurol <u>37,</u>412-413
- Hou J, Major EO (2000): Progressive multifocal leukoencephalopathy: JC virus induced demyelination in the immune compromised host. J Neurovirol. 2000 May; <u>6</u> Suppl 2:S98-S100.
- Inui K, Miyagawa H, Sashihara J, Miyoshi H, Tanaka-Taya K, Nishigaki T, Teraoka S, Mano T, Ono J, Okada S (1999): Remission of progressive multifocal leukoencephalopathy following highly active antiretroviral therapy in a patient with HIV infection. Brain Dev. 1999 Sep;<u>21(6)</u>:416-419.
- Iranzo A, Moreno A, Pujol J et al. (1999): Proton magnetic resonance spectroscopy pattern of progressive multifocal leukoencephalopathy in AIDS. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1999 Apr; <u>66(4)</u>: 520-523
- Jochum W, Weber T, Frye S, Hunsmann G, Lüke W, Aguzzi A (1997): Detection of JC-Virus by anti-VP1 immunohistochemistry in brains with progressive multifocal leukoencephalopathy. Acta Neuropath 1997 Vol. 94 (3): 226-231
- Kasner SE, Galetta SL, McGowan JC, Grossman RI (1997): Magnetization transfer imaging in progressive multifocal leukoencephalopathy.
 Neurology 48, 534-6 Issn: 0028-3. 878
- Katz DA, Berger JR, Hamilton B, Major EO, Post MJ (1994): Progressive Multifocal Leukoencephalophathy Complicating Wiskott-Aldrich Syndrom. Report of a Case and Review of the Literature of Progressive Multifocal Leukoencephalopathy With Other Inherited Immunodeficiency States. Arch Neurol <u>51</u>, 422-426

- Kleiman MB, Carol KL, Blackburn et al. (1983): Rapid Diagnosis of Measles using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Measles Immunglobulin M. Diagn Microbiol Infect Dis 1983, <u>1</u>, 205-213
- Knowles WA, Gibson PE, Hand JF, Brown DWG (1992): An M-antibody capture radioimmunoassay (MACRIA) for detection of JC virus-specific IgM. J Virol Methods <u>40</u>, 95-105
- Konishi E, Mason PW, Shope RE (1996): Enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant antigens for serodiagnosis of japanese encephalitis. J Med Virol <u>48</u>, 76-79
- Krupp LB, Lipton RB, Swerdlow ML, Leeds NE, Llena J (1985): Progressive Multifocal Leukoencephalopathy: Clinical and Radiographic Features. Ann Neurol <u>17</u>, 344-349
- Kuchelmeister K, Gullotta F, Bergmann M, Angeli G, Masini T (1993): Progressive Multifocal Leukoencephalopathy (PML) in the Acquired Immundeficiency Syndrome (AIDS). A Neuropathological Autopsy Study of 21 Cases. Pathol Res Pract <u>189</u>, 163-173
- Laemmli UK (1970): Ceavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature <u>227</u>, 680-685
- Lang W, Miklossy J, Deruaz JP, Pizzolato GP, Probst A, Schaffner T, Gessage E, Kleihues P (1989): Neuropathology of the acquired immune deficiency syndrome (AIDS): a report of 135 consecutive autopsy cases from Switzerland. Acta Neuropathol (Berl) <u>77</u>, 379-390
- Laubenberger J, Bayer S, Thiel T, Hennig J, Langer M (1998): Clinical uses of proton magnetic resonance spectroscopy of the brain. Rofo Fortschr Geb Rontgenstr Neuen Bildg Verfahr. 1998 Jun; <u>168</u> (6); 539-549

- Ledoux S, Libman I, Robert F, Just N (1989): Progressive Multifocal Leukoencephalopathy with Gray Matter Involvement. Can J Neurol Sci <u>16</u>, 200-202
- Levy JD, Cottingham KL, Campell RJ, Moore GK, Gyorkey F, Ashizawa T, Goldman AM (1986): Progressive multifocal leukoencephalopathy and magnetic resonance imaging. Ann Neurol <u>19</u> (4), 399-401
- Lipton RB, Krupp L, Horoupian D, Hershkovitz S, Arezzo JC, Kurtzberg D (1988): Progressive multifocal leukoencephalopathy of the posterior fossa in a AIDS patient: clinical, radiographic and evoked potential findings. Eur Neurol <u>28</u>, (5), 258-261
- Lortholary O, Pialoux G, Dupont B, Trotot P, Vazeux R, Mikol J, Thiebaut JB, Gonzalez-Canali G (1994): Prolonged survival of a patient with AIDS and progressive multifocal leukoencephalopathy. Clin Infect Dis <u>18</u> (5), 826-827
- Major EO, Amemiya K, Tornatore CS, Houff SA, Berger JR (1992):
 Pathogenesis and Molecular Biology of Progressive Multifocal
 Leukoencephalopathy, the JC Virus-Induced Demyelinating Disease of
 the Human Brain. J Clin Mirobiol Rev <u>5</u>, 49-73
- Maniez-Montreuil M, Dupressoir MV, Noel L, Couroucé A-M (1987): Interference of Rheumatoid Factor in Competitive HIV Assay. Lancet 1987 Aug, S. 520
- Martin JD, Padgett BL, Walker DL (1983): Characterization of tissue cultureinduced heterogenity in DNAs of independent isolates of JC virus. J Gen Virol <u>64</u>, 2271-2280

- McGuire D, Barhite S, Hollander H, Miles M (1995): JC Virus DNA in Cerebrospinal Fluid of Human Immunodeficiency Virus-infected Patients: Predictive Value for Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. Ann Neurol, <u>37</u>, 395-399
- Melnick JL, Allison AC, Butel JS, Eckhart W, Eddy BE, Kit S, Levine AJ, Milles JAR, Pagano JS, Sachs L, Vonka V (1974): Papovaviridae. Intervirology <u>3</u>, 106-120
- Miller JR, Barrett RE, Britton CB, Tapper ML, Bahr GS, Bruno PJ, Marquardt MD, Hays AP, McMurtry JG, Weissman JB, et al. (1982):
 Progressive Multifocal Leukoencephalopathy in a Male Homosexual T-Cell Immune Deficiency. N Engl J Med <u>307</u>, 1436-1438
- Miralles P, Berenguer J, Garcia de Viedma D, Padilla B, Cosin J, Lopez Bernaldo de Quiros JC, Munoz L, Moreno S, Bouza E (1998):
 Treatment of AIDS-associated progressive multifocal leukoencephalopathy with highly active antiretroviral therapy. Aids <u>12</u> (18), 2467-2472
- Moret H, Guichard M, Matherson S, Katlama C, Sazdovitch V, Huraux J-M, Ingrand D (1993): Virological Diagnosis of Progressive Multifocal Leukoencephalopathy: Detection of JC Virus DNA in Cerebrospinal Fluid and Brain Tissue of AIDS Patients. J Clin Microbiol <u>31</u>, 3310-3313
- Müller F, Moskophidis M, Borkhardt H-L (1987): Detection of immunoglobulin M antibodies to Treponema pallidum in a modified enzyme-linked immunosorbent assay. Eur J Clin Microbiol Feb. 1987; 6(1), 35-39

- Newton HB, Makley M, Slivka AP, Li J (1995): Progressive multifocal leukoencephalopathy presenting as multiple enhancing lesions on MRI: case report and literature review. J Neuroimaging. 1995 Apr;<u>5(2)</u>:125-8.
- Padgett BL, Walker DL (1973): Prevalence of Antibodies in Human Sera against JC Virus, an Isolate from a Case of Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. J Infect Dis <u>127</u>, 467-470
- Padgett BL, Walker DL (1983): Virologic and Serologic Studies of Progressive Multifocal Leukoencephalopathy, in: Polyomaviruses and Human Neurological Diseases; hrsg. v. Server JL, Madden D, Alan R. Liss, Inc., New York 1983, 107-117
- Padgett BL, Walker DL, ZU RHEIN GM, Eckroade RJ, Dessel BH (1971): Cultivation of Papova-like Virus from human Brain with Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. Lancet 1971, <u>i</u> (712), 1257-1260
- Preskorn SH, Watanabe I (1979): Progressive multifocal leukoencephalopathy: cerebral mass lesions. Surg Neurol <u>12</u>, 231-234
- Price RW, Nielsen S, Horten B, Rubino M, Padgett B, Walker D (1983): Progressive Multifocal Leukoencephalopathy: A Burn-Out Case. Ann Neurol <u>13</u>, 227-231
- Reiber H, Lange P (1991): Quantification of virus-specific antibodies in cerebrospinal fluid and serum: sensitive and specific detection of antibody synthesis in brain. Clin Chem 37, 1153-60
- Richardson EP (1961): Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. N Engl J Med <u>265</u>, 815-823

- Roitt IM (1993): Leitfaden der Immunologie. 4. Aufl. Blackwell-Wiss.-Verl., 1993, S. 71
- Rollison DEM, Helzsouer KJ, Alberg AJ, Hoffman S, Hou J, Daniel R, Shah KV, Major EO (2002): Serum antibodies to JC virus, BK virus, simian virus 40 and the risk of incident primary malignant brain tumors in a Maryland cohort. Amer J Epidemiol in press,
- Sacktor N, Lyles RH, Skolasky R, Kleeberger C, Selnes OA, Miller EN, Becker JT, Cohen B, McArthur JC (2001): HIV-associated neurologic disease incidence changes: Multicenter AIDS Cohort Study, 1990-1998. Neurology 56, 257-60.
- Samorei IW, Schmid M, Pawlita M, Vinters HV, Diebold K, Mundt C, von Einsiedel RW (2000): High sensitivity detection of JC-virus DNA in postmortem brain tissue by in situ PCR. J Neurovirol 6, 61-74
- Scully RE, Mark EJ, McNeely WF, McNeely BU (1988): Case Records of the Massachusette General Hospital. Weekly Clinicopathological Exercises. Case 45-1988. N Engl J Med <u>319</u>, 1268-1280
- Shah, Keerti V (1996) Polyomaviruses. In: Fields BN (Hrsg) Virology, Lippincott-Raven, Philadelphia New York, 3. Auflage, Vol. 2, S.2027-43
- Silverman L, Rubinstein LJ (1965): Electron Microscopic Observations on a case of Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. Acta Neuropathol (Berl) <u>5</u>, 215-224
- Simone IL, Federico F, Tortorella C, Andreula CF et al. (1998): Localised 1H-MR spectroscopy for metabolic characterization of diffuse and focal brain lesions in patients infected with HIV. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1998 Apr; <u>64</u> (4): 516-523

- Smith CR, Sima AAF, Salit IE, Gentili F (1982): Progressive multifocal leukoencephalopathy: Failure of cytarabine therapy. Neurology <u>32</u>, 200-203
- Stiess R, 2002, Technischer Service, Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, Deisenhofen: Fernmündliche Mitteilung zur Lagerung von IgM-haltigen Seren
- Stoner GL, Ryschkewitsch CF, Walker DL, Webster HF (1986): JC papovavirus large tumor (T)-antigen expression in brain tissue of acquired immune deficiency syndrome (AIDS) and non-AIDS patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. Proc Natl Acad Sci U S A <u>83</u>, 2271-2275
- Stoner GL, Walker DL, Webster HF (1988 b): Age distribution of progressive multifocal leukoencephalopathy. Acta Neurol Scand <u>78</u>, 307-312
- Taguchi F, Kajioka J, Miyamura T (1982): Prevalence rate and age of acquisition of antibodies against JC virus and BK virus in human sera. Microbiol Immunol <u>26</u> (11), 1057-1064
- Telenti A, Aksamit AJ, Proper J, Smith TF (1990): Detection of JC Virus DNA by Polymerase Chain Reaction in Patients with Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. J Infect Dis <u>162</u>, 858-861
- Thomas L, Fateh-Moghadam A, Guder WG, Hofmann W, Reiber H, Lammers M (1991): Proteindiagnostik, Diagnose, Therapiekontrolle. Behringwerke AG, S. 48
- Tornatore C, Houff S, Curfman B, Mayers K, Winfield D, Major E (1991): Detection of JCV Genome in a Prolonged Survivor of Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. Neurology <u>41</u> (Suppl), 400

- Trebst C (1995) Quantifizierung der intrathekalen Immunantwort gegen JC-Virus für die Diagnose der progressiven multifokalen Leukoenzephalopathie. Med. Dissertation. Universität Göttingen
- Ueki K, Richardson EP Jr, Henson JW, Louis DN (1994): In situ polymerase chain reaction demonstration of JC virus in progressive multifocal leukoencephalopathy, including an index case. Ann Neurol. 1994 Oct; <u>36(4):670-3.</u>
- van Horn G, Bastien FO, Moake JL (1978): Progressive multifocal leukoencephalopathy: failure of response to transfer factor and cytarabine. Neurology <u>28</u>, 794-797
- Vollmer-Haase J, Young P, Ringelstein EB (1997): Efficacy of campothecin in progressive multifocal leukoencephalopathy. Lancet 349, 1366
- von Einsiedel RW, Fife TD, Aksamit AJ, Conford ME, Secor DL, Tomiyasu U, Itabashi HH, Vinters HV (1993): Progressive multifocal leukoencephalopathy in AIDS: a clinicopathologic study and review of the literature. J Neurol <u>240</u>, 391-406
- von Giesen HJ, Neuen Jacob E, Dörries K, Jablonowski H, Roick H, Arendt G (1997): Diagnostic criteria and clinical procedures in HIV-1 associated progressive multifocal leukoencephalopathy. J-Neurol-Sci 147, 63-72 issn: 0022-510 x
- Walker DL, Frisque RJ (1986): The Biology and Molecular Biology of JCVirus; in: The Papovaviridae, Vol.1: The Polyomaviruses; hrsg. v.Salzman NP; Plenum Press; New York 1986, 327-377

- Walker DI, Padgett BL, Zu Rhein GM, Albert AE, Marsh RF (1973): Human papovavirus (JC): induction of brain tumors in hamsters. Science <u>181</u>, 674-676
- Walker DL: Progressive multifocal leukoencephalopathy; in: Handbook of clinical neurology, Demyelinating Diseases.; hrsg. v. Vinken PJ, Bruyn GW, Klawans HL, Elsevier Science Publishers, Amsterdam 1985, 503 524
- Wasmuth JC, Wasmuth-Pietzuch A, Spengler U, Rockstroh JK (1999): [Progressive multifocal leukoencephalopathy]. Med Klin. 1999 May 15;94(5):264-73.
- Weber Т (1993): Diagnose der progressiven multifokalen virusspezifischer Leukoenzephalopathie durch den Nachweis Nukleinsäuren Habilitationsschrift, im Liquor zerebrospinalis, Universität Göttingen
- Weber T (1999): Cerebrospinal fluid analysis for the diagnosis of human immunodeficiency virus-related neurologic diseases [In Process Citation]. Semin Neurol 19, 223-33
- Weber T, Klapper PE, Cleator GM, Bodemer M, Luke W, Knowles W, Cinque P, Van Loon AM, Grandien M, Hammarin AL, Ciardi M, Bogdanovic G (1997): Polymerase chain reaction for detection of JC virus DNA in cerebrospinal fluid: a quality control study. European Union Concerted Action on Viral Meningitis and Encephalitis. J Virol Methods. 1997 Dec;<u>69</u>(1-2):231-7.
- Weber T, Major EO (1997): Progressive multifocal leukoencephalopathy: molecular biology, pathogenesis and clinical impact. Intervirology 40, 98-111

- Weber T, Trebst C, Frye S, Cinque P, Vago L, Sindic CJ, Schulz Schaeffer
 WJ, Kretzschmar HA, Enzensberger W, Hunsmann G, Luke W (1997):
 Analysis of the systemic and intrathecal humoral immune response in
 progressive multifocal leukoencephalopathy. J Infect Dis 176, 250-4
- Weber T, Turner RW, Frye S, Lüke W, Kretzschmer HA, Lüer W, Hunsmann G (1994 b): Progressive multifocal leukoencephalopathy diagnosed by amplification of JC virus-specific DNA from cerebrospinal fluid. AIDS <u>8</u>, 49-57
- Weber T, Turner RW, Frye S, Ruf B, Haas J, Schielke E, Pohle H-D, Lüke W, Lüer W, Felgenhauer K, Hunsmann G (1994 a): Specific Diagnosis of Progressive Multifocal Leukoencephalopathy by Polymerase Chain Reaction. J Infect Dis <u>169</u>, 1138-1141
- Wee JLK, Ho LC, Yap EH, Singh M (1992): A monoclonal based IgM capture ELISA for detection of antibodies to 22 and 41 kDa membrane antigens of Toxoplasma gondii. Parasitology 1992, <u>104</u>, 25-31
- Whiteman MLH, Post MJD, Berger JR, Tate LG, Bell MD, Limonte LP (1993): Progressive Multifocal Leukoencephalopathy in 47 HIVseropositive Patients: Neuroimaging with Clinical and Pathologic Correlation. Radiology <u>187</u>, 233-240
- Yiannoutsos CT, Major EO, Curfman B, Jensen PN, Gravell M, Hou J, Clifford DB, Hall CD (1999): Relation of JC Virus DNA in the cerebrospinal fluid to survival in aquired immunodeficiency syndrome patients with biopsy-proven progressive multifocal leukoencephalopathy. Ann Neurol. 1999 Jun; <u>45(6)</u>: 816-821

- Zeeck A, Eick S, Krone B, Schröder K (1993): Chemie für Mediziner. 2. Aufl., Urban und Schwarzenberg Verl. München-Wien-Baltimore, 1992, S. 275
- Zimmermann T, Stingele K, Hartmann M, Haas J, von Einsiedel R, Wildemann B (2001): Successful treatment of AIDS related PML with HAART and cidofovir. Eur J Med Res 6, 190-62.
- Zu Rhein GM, Chou S-M (1965): Particles resembling Papova Viruses in Human Cerebral Demyelinating Disease. Science <u>148</u>, 1477-1479
- Zu Rhein GM, Padgett BL, Walker DL, Chun RWM, Horowitz SD, Hong R (1978): Progressive Multifocal Leukoencephalopathy in a Child with Severe Combined Immunodeficiency. N Engl J Med <u>299</u>, 256-257

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Astrid Kappuhne

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Thomas Weber für die Überlassung dieses interessanten Themas, seine hervorragende Betreuung und sein Engagement in jeder Phase der Entstehung dieser Dissertation.

Exzellente technische Möglichkeiten, sowie jederzeit Rat und Beistand fand ich im Neurochemischen Labor des Marienkrankenhauses Hamburg, wofür ich allen Mitarbeitern ganz herzlich danken möchte. Insbesondere gilt mein Dank Frau Simone Amati und Frau Michaela Habicht, die mich sehr hilfsbereit und mit viel Geduld in die Labormethoden eingearbeitet haben und mir im Verlauf immer wieder Hilfestellung gaben. Ein weiterer Dank geht an Dr. Markus Pickhardt, der neben technischen Tipps auch immer neue Anregungen einbrachte.

Frau Dr. Wendy Knowles danke ich sehr für die Bereitstellung von Seren, die als Referenz die Grundlage für die Entwicklung dieses serologischen Tests bilden und ohne die sich unsere Bemühungen vielleicht erfolglos gezeigt hätten.

Nicht nur die medizinisch / technische Seite einer Dissertation, sondern auch deren formelle Erstellung hat ihre Tücken. Für viele hilfreiche Ratschläge bezüglich der modernen Datenverarbeitung danke ich ganz besonders Herrn Christian Masuch.

Lebenslauf

Ich wurde am 13. Februar 1974 in Northeim geboren. Meine Mutter Annemarie Kappuhne geb. Rosenberg ist Krankenschwester und mein Vater Dr. Manfred Kappuhne ist Rechtsanwalt und Notar.

Meine gesamte Schulzeit verbrachte ich in Northeim. Im Sommer 1980 wurde ich in die Martin-Luther-Schule eingeschult. Es folgte die Orientierungsstufe in der Thomas-Mann-Schule von 1984 bis 1986. Ab 1986 besuchte ich das Gymnasium Corvinianum, wo ich 1993 mein Abitur ablegte.

Ich begann mein Medizinstudium an der Universität Hamburg im Wintersemester 1993/94. 1995 bestand ich die Ärztliche Vorprüfung und ein Jahr später den ersten Teil der ärztlichen Prüfung. Meine Famulaturen absolvierte ich in verschiedenen Hamburger Krankenhäusern und einer Hamburger Praxis in den Fächern Allgemeinmedizin, Chirurgie, Neurologie und Ophthalmologie. Eine Famulatur im Fach Neurochirurgie verbrachte ich im Northwestern Memorial Hospital in Chicago. Der zweite Teil der Ärztlichen Prüfung folgte im Frühjahr 1999 und ich begann im Anschluß mein Praktisches Jahr mit dem chirurgischen Tertial im Albertinen-Krankenhaus Hamburg. Das internistische Tertial verbrachte ich im Krankenhaus Alten Eichen in Hamburg, gefolgt von vier Monaten Ophthalmologie in der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf. Ich schloss mein Studium im Juni 2000 mit dem dritten Teil der Ärztlichen Prüfung ab.

Meine Entscheidung für die Ophtalmologie führte mich als Ärztin im Praktikum im August 2000 an die Universitätsaugenklinik Düsseldorf, wo ich auch jetzt noch als Assistenzärztin tätig bin.

Einige Daten dieser Arbeit durfte ich im Juni 2002 auf dem 4. Internationalen Symposium für Neurovirologie in Düsseldorf im Rahmen eines Vortrages veröffentlichen. Mein wissenschaftlicher Schwerpunkt liegt nun jedoch in der Augenheilkunde. Zur Zeit führe ich klinische Studien zur Zyklophotokoagulation bei Patienten mit Glaukom durch. Erste Ergebnisse wurden im September 2002 auf der Jahrestagung der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft als Poster veröffentlicht.