

Ingrid Wendy Samorei

Dr.sc.hum.

**Topographischer Nachweis von neurotrophen Viren in Formalin-fixiertem Probenmaterial mit der sensitiven *in situ* (reverse Transkriptase-) Polymerase-Kettenreaktion: JC-Virus und Borna Disease Virus**

Geboren am 05.04.1971 in Wordsley, England

Reifeprüfung am 15.05.1990 in Philippsburg

Studiengang der Fachrichtung Biotechnologie vom WS 1990 bis SS 1995

Vordiplom am 03.09.1992 an der Fachhochschule Mannheim, Hochschule für Technik und Gestaltung

Diplom am 30.09.1995 an der Fachhochschule Mannheim, Hochschule für Technik und Gestaltung

Studiengang der Fachrichtung Immunologie vom WS 1995 bis WS 1996

Master of Science am 07.01.1997 an der University of Surrey, England

Promotionsfach: Psychiatrie

Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. J. Schröder

Mit der *in situ* Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können geringste Mengen Nukleinsäure in einzelnen Zellen detektiert werden. Die Target-Nukleinsäure wird zunächst intrazellulär mit der PCR amplifiziert und anschließend in morphologisch intaktem Gewebe mit der *in situ* Hybridisierung (ISH) markiert und lichtmikroskopisch visualisiert. Die *in situ* PCR-Methode ist wegen ihrer Komplexität und ihres hohen Validierungsaufwandes diffizil, Standardprotokolle stehen nicht zur Verfügung. Für jedes Ausgangsmaterial und jede Target-Sequenz ist eine individuelle Optimierung und Validierung erforderlich. Die Untersuchung von Formalin-fixiertem, in Paraffin eingebettetem Material ist besonders heikel, da nicht abzuschätzen ist, ob die Nukleinsäure zum Zeitpunkt der Untersuchung bereits degradiert ist und mit einem deutlichen Sensitivitätsverlust in der PCR zu rechnen ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die *in situ* (RT-) PCR-Methode für den Nachweis von DNA- und RNA-Viren in Formalin-fixiertem und in Paraffin eingebettetem Probenmaterial erfolgreich etabliert und validiert, sie stellte sich als reliable und reproduzierbare Technik dar. Um falsche *in situ* (RT-) PCR-

Ergebnisse auszuschließen, wurde ein besonderes Augenmerk auf spezifische Kontrollen gerichtet.

Das humane Polyomavirus JC (JCV) kommt ubiquitär vor, mehr als 90% der adulten Bevölkerung sind seropositiv. Die Primärinfektion verläuft üblicherweise inapparent, erst bei einer dauerhaften Suppression der zellulären Immunabwehr kann das Virus eine opportunistische, subakute Erkrankung des ZNS hervorrufen, die progressive multifokale Leukenzephalopathie (PML). JCV infiziert im ZNS vornehmlich die Oligodendrozyten.

JCV-DNA wurde in postmortalem Hirngewebe von neun AIDS-Patienten, die an einer PML erkrankt waren, mit der *in situ* PCR detektiert. Die *in situ* PCR war in den morphometrischen Messungen zwei- bis dreimal sensitiver als die konventionelle ISH. Mit dieser sensitiven Technik konnten neue Erkenntnisse zerebraler JCV-Infektionen erlangt werden. Aufgrund der Sensitivität der *in situ* PCR konnte erstmals eine differenzierte intrazerebrale Gradeinteilung der PML in fünf Stadien vorgenommen werden. Diese Einteilung bezog sich auf neuropathologische, jedoch nicht auf klinische Befunde, denn alle AIDS-Patienten waren an den Folgen einer PML verstorben. Der Vergleich der Ergebnisse zwischen *in situ* PCR und ISH ermöglichte die Skizzierung des zeitlichen Verlaufs einer JCV-Infektion im ZNS. Bisher unbekannte intrazelluläre JCV-Infektionsmuster der Oligodendrozyten konnten mit der *in situ* PCR beobachtet und mit verschiedenen Replikationsstadien des JC-Virus korreliert werden. Neben den PML-typischen JCV-infizierten Oligodendrozyten mit pathognomonisch vergrößerten, JCV-DNA-haltigen Zellkernen, wurden mit der *in situ* PCR auch Zellen detektiert, die JCV-DNA sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma enthielten. Andere Oligodendrozyten wiesen JCV-DNA ausschließlich im Zytoplasma auf, der Kern blieb JCV-negativ. Schließlich wurden runde Färbeprodukte entdeckt, die sillhouettenhaft oligodendrozytische Zellstrukturen abbildeten und das Erscheinungsbild von "Ghost-Zellen" aufwiesen. Auch Zellen nicht-glialen Ursprungs wurden als JCV-infiziert identifiziert. Beispielsweise konnte erstmalig gezeigt werden, daß HIV-Riesenzellen, die die einzigen pathognomonischen Befunde bei einer zerebralen HIV-Infektion sind, neben HIV auch mit JCV infiziert sein können. Perivaskuläre Lymphozyteninfiltrate, Neurone und das Hirngewebe von Patienten ohne PML blieben wiederholt JCV-negativ.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Übertragbarkeit der *in situ* PCR für die Detektion von DNA auf die ungleich schwerere Untersuchung viraler RNA geprüft. Dazu wurde die *in situ* PCR-Technik auf den Nachweis von Borna Disease Virus (BDV)-RNA

in BDV-infizierten, Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Mandin-Darby-Canine-Kidney (MDCK)-Zellen transferiert. Der Nachweis von BDV-RNA war erst möglich, nachdem die Sensitivität der *in situ* RT-PCR Methode durch die Signalamplifizierung mit der TSA-Methode zusätzlich erhöht wurde.

BDV ist ein nicht-segmentiertes Einzelstrang-RNA-Virus negativer Polarität, das viele Warmblüter infizieren und in einigen Spezies -vor allem in Pferden und Schafen- die Borna'sche Krankheit auslösen kann. Das ist eine akute oder chronische nicht-eitrige Meningoencephalomyelitis, die klinisch Verhaltensanomalien oder Symptome im peripheren Nervensystem hervorrufen und bei Tieren letal verlaufen kann. Die Erkrankung ist bereits vor über 200 Jahren erstmalig bei Pferden in der Stadt Borna beschrieben worden. In der jüngeren Literatur häufen sich Hinweise, daß der Mensch nicht nur latenter BD-Virussträger ist, sondern an BDV neuropsychiatrisch erkranken kann. Im Vergleich zu psychiatrisch gesunden Probanden konnte bei psychiatrischen Patienten eine konstant höhere Seroprävalenz beobachtet werden. Eine eindeutig klinisch-neuropathologische Korrelation war bisher aber nicht möglich. Die *in situ* RT-PCR-Untersuchung zum Nachweis von BDV in MDCK-Zellen diente der Vorbereitung für ein humanes BDV-Projekt. Das Ziel des Nachfolgeprojekts wird die Untersuchung der Inzidenz einer BDV-Infektion in postmortalem Hirngewebe psychiatrischer Patienten sein, um eine Assoziation zwischen einer zerebralen BDV-Infektion und einer klinisch neuropsychiatrischen Erkrankung zu verifizieren oder falsifizieren.