



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Fakultät für Klinische Medizin Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

**Entwicklung einer quantitativen Polymerasekettenreaktion zum
Nachweis des Polyomavirus JC im Liquor cerebrospinalis**

Autor: Marie Schütte de Lujan
Institut / Klinik: Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene
Doktorvater: Prof. Dr. R. Dörries

Die Progressive Multifokale Leukenzephalopathie (PML) ist die einzige klinische relevante Erkrankung, die mit einer Infektion des humanen Polyomavirus JCV beschrieben wurde. Diese degenerative Erkrankung des Gehirns ist Folge einer lytischen Infektion von Oligodendrogliazellen durch JCV bei einer zugrundeliegenden systemischen Erkrankung mit starkem immunsuppressiven Charakter, wie etwa AIDS. Zur Verbesserung der diagnostischen und prognostischen Situation sollte in dieser Arbeit ein Verfahren etabliert werden, das die routinemäßige Quantifizierung der Viruslast von JCV im Liquor cerebrospinalis erlaubt. Dieses Ziel sollte mit einer kompetitiven PCR erreicht werden, deren Ergebnisse nicht wie üblicherweise visuell in einer elektrophoretischen Auftrennung der Amplifikate, sondern mit Hilfe eines Enzymimmunoassays (EIA) zur Detektion von Nukleinsäurehybriden evaluiert werden sollten.

Die für eine quantitative PCR notwendige kompetitive DNA-Sequenz wurde durch geeignete Primerwahl in Form einer Deletionsinsertionsmutante innerhalb eines PCR-Laufes konstruiert. Dieser modifizierte Sequenzabschnitt aus dem Bereich des viralen T-Antigens wurde in ein Bakterienplasmid kloniert und die erfolgreiche Durchführung dieser Klonierung konnte in einer Restriktionsenzymanalyse und einer Sequenzierungsreaktion nachgewiesen werden.

In mehreren Schritten wurden die optimalen Bedingungen für die kompetitive PCR und den EIA ermittelt und mit klonierter genomischer JCV-DNA überprüft. Nach erfolgreicher Etablierung eines quantitativen PCR-EIA wurden an 9 verschiedenen Liquores von 6 Patienten mit gesicherter PML die Praktikabilität des Nachweissystems erprobt. Es zeigte sich, daß mit diesem Verfahren eine quantitative Analyse der JC-Viruslast in einem weiten Messbereich von $10^{2,6}$ bis 10^9 Genomkopien/ml möglich ist. Ein Befund unterhalb der Nachweisgrenze läßt allerdings den Ausschluß einer PML nicht zu, da in zwei Liquorproben trotz nachgewiesener PML keine JCV- DNA detektiert werden konnte. Es müssen nach wie vor klinische, radiologische und molekularbiologische Befunde bei der Diagnose einer PML berücksichtigt werden.