Bedeutung der Polymerase chain reaction (PCR) für neue diagnostische Ansätze im Bereich des Zentral-Nervensystems

Significance of the Polymerase Chain Reaction (PCR) as New Diagnostic Approach to the Central Nervous System

A. Rolfs, H. C. Schumacher, A. Ney, M. Vallée, Ines Weber, Mirjana Würdemann, Barbara Trampenau

Abteilung für Neurologie (Direktor: Prof. Dr. P. Marx), Neurochemisches Forschungslabor (Leiter: Dr. A. Rolfs) im Klinikum Steglitz, Freie Universität Berlin

Zusammenfassung:

Die Polymerase chain reaction (PCR) hat in kürzester Zeit gezeigt, daß sie als extrem sensitive und rasch auswertbare Methodik für die Diagnostik von ZNS-Erkrankungen in wenigen Jahren unentbehrlich sein wird und die bisherige virologische und mikrobiologische Diagnostik auf dem neurologischen Sektor verdrängen wird. Auch für das Verständnis bislang ungeklärter degenerativer und autoimmunologischer ZNS-Störungen wird diese Methode Wesentliches beitragen. Es ist zu erwarten, daß eine Vielzahl bislang unverstandener, genetisch fixierter ZNS-Erkrankungen unter Zuhilfenahme der PCR in naher Zukunft aufgeklärt werden kann. Bei aller Euphorie ist jedoch nicht zu übersehen, daß die Anwendung der PCR derzeit nur einigen klinischen Speziallabors vorbehalten bleibt, die Methode – vor allem durch Möglichkeiten der Kontamination von Fremd-DNS – äußerste Präzision verlangt sowie die ständige Kontrolle der Ergebnisse durch eine Reihe unterschiedlicher Negativkontrollen.

Schlüsselwörter:

Polymerase chain reaction – PCR – neurotrope Viren – Liquor-Diagnostik – HIV-I – entzündliche ZNS-Erkrankungen – Hirnbiopsie

Summary:

The polymerase chain reaction (PCR), an extremely sensitive method that can be evaluated very quickly, has demonstrated in a very short time that it will become indispensable for the diagnosis of diseases of the CNS in a few years. It will supersede the virological and microbiological diagnosis in the neurological sector. This method will also contribute a great deal to degenerative and autoimmunological disorders of the CNS that have not yet been clarified. It can be expected that clarification of a large number of geneticàlly fixed diseases of the CNS that have not yet been understood, will be possible with PCR in the near future. Despite of all the euphoria it should not be overlooked, however, that the application of PCR is presently restricted to only a small number of specialized clinical laboratories and that, mainly because of the possibility of contamination of foreign DNA, the method requires extreme precision as well as constant control of the results by a number of different negative controls.

Keywords:

Polymerase chain reaction – PCR – neurotropic viruses – CSF-diagnostics – HIV-I – inflammations of the CNS – brain biopsy

---

Einleitung

Untersuchungen bzw. diagnostische Verfahren, die die Aufklärung entzündlicher Veränderungen des Zentral-Nervensystems (ZNS) oder die ätiologische Klärung bestimmter Erkrankungen des Nervensystems zum Ziel haben, sind mehrere Schwierigkeiten zu eigen:

1. Die Gewinnung ausreichender Mengen spezifischen Materials (Hirngewebe, Liquor cerebrospinalis [CSF]) für konventionelle Untersuchungen ist äußerst kompliziert, wenn nicht gar unmöglich.

2. Auch bei Anwendung operativer Eingriffe (offene oder stereotaktische Hirnbiopsie) oder der Gewinnung großer CSF Volumina benötigt eine virologische oder mikrobiologische Diagnostik zumindest drei bis fünf Tage, wenn nicht sogar Wochen, um sichere Aussagen machen zu können. Trotz mittlerweile ausgewogener Methoden im virologisch/mikrobiologischen Sektor, ergeben sich daraus für den Kliniker nur in den seltensten Fällen hilfreiche Befunde. Im Klinikum Steglitz erbrachten konventionelle virologische Untersuchungen in der Zeit von 1985 bis 1989 bei 471 Patienten mit sicheren viralen ZNS-Erkrankungen nur in 6% eine Klärung der Ursache. Bei sicheren bakteriellen Erkrankungen des ZNS ließ sich im gleichen Zeitraum bei 135 Patienten in nur 29% der Fälle ein Erreger nachweisen.

3. Die Notwendigkeit der raschen Einleitung einer Therapie ergibt sich bei häufig akut bedrohlichen ZNS-Infektionen von selbst – zumal in den letzten Jahren vermehrt auch Virostatika zur Verfügung stehen. Diese Therapie sollte vor dem Hintergrund der zunehmenden Häufigkeit von Erreger-Resistenzen auch noch spezifisch sein und nicht einer „Schrotschuß-Therapie" entsprechen.

4. Viele heredodegenerative Erkrankungen des ZNS spielen sich auf DNS/RNS Ebene ab. Untersuchungen zur Ätiologie und zum Verständnis dieser Störungen können meist nur post mortem durchgeführt werden, da auch hier die Möglichkeit fehlt, in vivo adäquate Untersuchungsproben zu erhalten.

All diese Probleme machen die Etablierung einer einerseits rasch durchführbaren, andererseits diagnostisch extrem sensitiven und zugleich spezifischen Nachweismethode auf der Ebene des genetischen Codes erforderlich.

Es bietet sich hierfür die Methodik der Polymerase chain reaction (PCR) an.

Methodik

Die PCR ist eine In-vitro-Methode für die enzymatische Vervielfältigung spezifischer DNS-Sequenzen. Der entscheidende Vorteil der PCR ist die Tatsache, daß aus winzigsten Mengen von Ausgangs-DNS (z. B. 10 bis 15 Virus-Genome/10 000 Patientenzellen) (5) spezifisch große Mengen amplifiziert werden können und so in der Weitertestung konventionellen Nachweismethoden (southern blot, dot blot, slot blot, restriction enzyme testing) zugänglich werden. Eingeführt wurde diese revolutionäre Methode durch Kary Mullis (1–3) für die pränatale Diagnose der Sichelzell-Anämie.

Zur Durchführung der PCR sind im wesentlichen folgende Reagentien bzw. Geräte erforderlich: das Schlüsselenzym Taq-Polymerase, zwei zuvor – meist nach Vorlage der bekannten DNS-Sequenz – künstlich synthetisierte kurze DNS-Fragmente (Oligonucleotide, Primer), die Ausgangs-DNS (Template), die aus Blut-, Liquor- oder Gewebezellen zumeist durch eine konventionelle Phenol/Chloroform-Extraktion gewonnen wird, sowie ein steuerbarer Thermoblock bzw. ein Wasserbad. Durch die repetitive Wiederholung zumeist dreier verschiedener Temperaturzyklen im Thermoblock bzw. Wasserbad werden folgende Reaktionen ermöglicht: 1. die Denaturierung der Ausgangs-DNS (meist bei 95 °C), 2. die Hybridisierung der beiden spezifischen Primer (annealing) mit auf dem sense und antisense DNS-Strang gelegenen Regionen, die die interessierende DNS-Sequenz flankieren (unabhängig vom Schmelzpunkt [T_m-Wert] der Primer meist zwischen 40° und 65 °C) sowie 3. unter Einbau von in der Reaktion vorhandenen Nukleotiden (dNTP's) eine Verlängerung der hybridisierten Primer durch die Taq-Polymerase (72 °C).

Die ca. dreißigmalige Wiederholung dieser drei Temperaturschritte führt zu einer exponentiellen Akkumulation des spezifi-

schen Fragmentes, dessen Enden durch die 5' Enden der beiden benutzten Primer definiert werden. Da das aus dem ursprünglichen Primer durch die Verlängerung hervorgegangene Produkt im nächsten Temperaturzyklus seinerseits als Template dienen kann, kommt es mit jedem Zyklus zu einer annähernden Verdopplung der zu untersuchenden DNS. Die Vervielfältigung erfolgt damit nach der Formel 2^n, wobei n der Anzahl der Temperaturzyklen entspricht. Aufgrund der hohen Effizienz der PCR ist es für jedes Amplifikat unumgänglich, daß dessen Spezifität nachgewiesen wird, sei es durch Hybridisierungsverfahren oder den Nachweis spezifischer Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen. Die Spezifität der Amplifikations-Produkte in der PCR-Reaktion selbst wird dabei durch das Anlagern der genau definierten Primerpaare an spezifisch komplementäre DNS-Sequenzen definiert. Einschließlich des Spezifitätsnachweises kann die gesamte Nachweis-Reaktion in ca. 10 bis 14 Stunden erfolgen.

Bedingt durch die hohe Sensitivität und die rasche Durchführbarkeit ist die PCR damit die ideale Nachweismethode, um virale und bakterielle Strukturen im Gehirngewebe oder CSF zu diagnostischen Zwecken nachzuweisen bzw. die Ätiologie bestimmter Erkrankungen des ZNS aufzuklären.

Nachweis viraler und bakterieller Strukturen bei entzündlichen ZNS-Veränderungen

Entzündliche Erkrankungen des ZNS im Sinne einer Encephalitis oder Meningitis teilen sich fast immer in pathologischen Veränderungen des Liquor cerebrospinalis (CSF) mit. Die Gewinnung von ca. 5 ml CSF im Rahmen einer routinemäßigen Lumbalpunktion ermöglichte bislang nach Durchführung einer modifizierten DNA-Präparation (4) unter Einsatz der PCR den Nachweis des Cytomegalievirus (CMV) (5), Epstein-Barr-Virus (EBV) (6), Herpes simplex (7) sowie retroviraler (8, 9) Elemente. Am Beispiel des Nachweises von HIV-I Provirus-Sequenzen im CSF soll die Bedeutung der PCR verdeutlicht werden.

Im Rahmen einer prospektiven Studie untersuchten wir mittels der Methodik der PCR DNS aus lymphomonozytären Zellen des Liquors und Blutes von bislang 32 HIV-I infizierten asymptomatischen Patienten auf verschiedene HIV-I spezifische Gen-Regionen: env, gag, LTR, eine Neuroleukin-homologe Region, die CD4-Bindungsregion und die sogenannte CPE-Region (10), die für den cytopathischen Effekt mitverantwortlich gemacht wird. Als Positivkontrolle diente der BH10-Klon, als Negativkontrolle genomische DNS HIV-I-negativer Patienten, als internen Standard benutzten wir β-Globin-Primer. Für die PCR-Reaktion setzten wir je 0,1 μg genomische DNS ein. Die Reaktionsbedingungen wurden entsprechend Saiki und Mitarbeiter (11) gewählt. Die Markierung der amplifizierten Produkte erfolgte durch den radioaktiven Einbau von 32P-dCTP während der PCR-Reaktion. Die Separation der Amplifikate wurde in einem 6% Harnstoff-Polyacrylamid-Gel durchgeführt, das unter denaturierenden Bedingungen die Trennung der Amplifikate nach ihrem Molekulargewicht ermöglicht (1xTBE-Lauf-Puffer, 300V über 2½ Stunden). Nach Exposition eines Röntgenfilms über eine standardisierte Zeit von meist 12–24 Stunden zeigen die Schwärzungen die Lage der radioaktiven Amplifikate an. Wegen der Gefahr unspezifischer Amplifikate ist stets die Testung der Spezifität der Amplifikate notwendig. Es bieten sich hier Hybridisierungen mit Farbstoff-markierten Sonden an (dot blot, southern blot) oder die Verwendung von bekannten Restriktionsendonuklease-Schnittstellen. Die letzte Methodik wurde in diesem Experiment angewandt. Unter Verwendung von konventionellen DNA-Daten-Banken lassen sich genau definierte Restriktions-Schnittstellen in der HIV-I-Sequenz aufzeigen. So zerschneidet beispielsweise das Restriktionsenzym HinfI das 114 Basenpaar (bp)-Amplifikat aus der CD4-Bindungsregion in ein 67bp und 47bp Fragment. Entstehen nach Inkubation des Amplifikates mit dem Enzym exakt diese Fragmente, so ist dies als spezifisch zu werten (Abb. 1). Ist dies nicht der Fall, handelt es sich um ein unspezifisches Produkt oder – mit deutlich geringerer Wahrscheinlichkeit – um eine Mutation im Bereich der Schnittstelle.

Die β-Globin-Amplifikation erwies sich in allen Proben als positiv, so daß von einer intakten DNS als Ausgangsmaterial für die Reaktion ausgegangen werden konnte. Es ergaben sich unterschiedliche Muster für die HIV-I-Amplifikate im Liquor und Blut. Der gag-Nachweis im CSF und Blut gelang übereinstimmend am häufigsten in 31/32 bzw. 30/32 Fällen. Deutlich geringere Prozentsätze ergaben sich für die LTR-, NRO- und CD4-Region. Hier fanden sich nur noch Werte zwischen 6 und 25% im Blut und 15 bis 21% im Liquor. Es gab keine HIV-I-Antikörper-positiven Proben, aus denen nicht zumindest eine HIV-I-Region im PCR-Ansatz amplifiziert werden konnte. Interessanterweise ließ sich in einigen Proben ein vergrößertes LTR-Amplifikat nachweisen, dessen Größe sich auf ca. 140bp schätzen läßt, wogegen die erwartete Größe bei 103bp liegt. Auffällige Unterschiede zwischen CSF und Blut ergaben sich bezüglich der CPE-Region. Hier fanden sich positive Amplifikate im CSF in knapp 50% und im Serum lediglich in 19%.

Die PCR zum Nachweis von HIV-I-Genregionen im CSF und Blut erwies sich in dieser Studie als ein schnelles Verfahren, um eine sichere HIV-I-Infektion nachzuweisen. Frühere Publikationen belegten, daß gerade im Rahmen einer HIV-I-Frühinfektion konventionelle Testverfahren, wie Antigen-Test oder gar Antikörper-Nachweis, versagen (12); Anzüchtungsexperimente sind langwierig und in der Handhabung schwierig. Die Amplifikation viraler Zielsequenzen stellt unter Berücksichtigung bestimmter „Vorsichtsmaßnahmen" (ausnahmslos Verwendung von autoklavierten Gegenständen und Materialien – stets Handschuhe tragen – UV-Bestrahlung von Pipetten, Arbeitsplatz etc. – räumliche Trennung der Laborräume, in denen die DNA präpariert wird, von jenen, in denen die PCR pipettiert wird) eine sichere Alternativmethode dar.

Neben dem Nachweis viraler Strukturen im CSF ist bei unklaren Raumforderungen bzw. Encephalitiden die Durchführung einer stereotaktischen Biopsie oft unumgänglich (13). In eigenen Untersuchungen konnten wir mit Hilfe der Stereotaxie und PCR spezifische DNS und RNS des EBV in primär intracerebralen Tumoren bei HIV-I-positiven Patienten nachweisen (6) als auch in encephalitischen Herden CMV (4); letzterer Befund wurde bei einem Patienten durch eine ca. sechs Monate später durchgeführte Autopsie im Sinne einer CMV-Encephalitis mit Eulenaugenzellen bestätigt. Rouah und Mitarbeiter beschrieben dieses Jahr vergleichbare Befunde (13). Unter Anwendung der PCR gelingt heute auch rasch der Masernvirus-Nachweis bei SSPE (14) sowie die Diagnose der cerebralen Toxoplasmose, eine Erkrankung, die immer wieder bei HIV-I-positiven Patienten diagnostische Probleme bereitet (15, 16).

Mit Hilfe der PCR ist es jedoch nicht nur möglich, entzündliche ZNS-Erkrankungen zu charakterisieren, sondern auch Strukturen wie das basische Myelinprotein (17), neurotrophe Wachstumshormone (Neurotrophin-3) (18), Zytokine in Astrozyten (19) und T-Zell Rearrangements bei Patienten mit Multipler Sklerose (20) nachzuweisen.

Schrifttum:

1. MULLIS, K. B., FALOONA, F. A.: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol. **155**, 335–350 (1987).
2. MULLIS, K. B., FALLONA, S., SCHARF, S., et al.: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symp Qaunt Biol. **51**, 263–273 (1986).
3. SAIKI, R. K., SCHARF, S., FALOONA, F. A., et al.: Enzymatic amplification of β-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science **230**, 1350–1354 (1985).
4. ROLFS, A., WEIGEL, K., PREUSS, M., et al.: Rapid detection of cytomegalovirus structures in cerebrospinal fluid and brain biopsies by polymerase chain reaction (eingericht zur Publikation).
5. SCHUMACHER, H. C., ROLFS, A., WÜRDEMANN, M., et al.: Rapid detection of CMV-specific DNA and mRNA in immunocompromised patients. In: PCR topics – Usage of polymerase chain reaction in genetic and infectious diseases. Hrsg.: A. Rolfs, H. C. Schumacher, P. Marx, Springer Verlag, Berlin (1991).
6. ROLFS, A., SCHUMACHER, H. C., PREUSS, M., et al.: Detection of EBNA2-mRNA in primary central nervous system lymphomas in patients with AIDS. In: PCR topics – Usage of polymerase chain reaction in genetic and infectious diseases. Hrsg.: A. Rolfs, H. C. Schumacher, P. Marx. Springer Verlag, Berlin (1991).
7. ROWLEY, A. H., WHITLEY, R. J., LAKEMAN, F. D., et al.: Rapid detection of herpes-simplex-virus DNA in cerebrospinal fluid of patients with herpes simplex encephalitis. Lances I, 440–441 (1990).
8. VALLEE, M., ROLFS, A., SCHUMACHER, H. C., et al.: Viral genome sequences in cerebrospinal fluid and serum of HIV-I infected but asymptomatic patients. In: PCR topics – Usage of polymerase chain reaction in genetic and infectious diseases. Hrsg.: A. Rolfs, H. C. Schumacher, P. Marx. Springer Verlag, Berlin (1991).
9. SHAUNAK, S., ALBRIGHT, R. E., KLOTMAN, M. E., et al.: Amplification of HIV-I provirus from cerebrospinal fluid and its correlation with neurologic disease. J. Infect Dis. **161**, 1068–1072 (1990).
10. FISHER, A. G., RATNER, L., MITSUYA et al.: Infectious mutant of HTLV-III with changes in the 3'region and markedly reduced cytopathic effects. Science **323**, 655–659 (1986).
11. SAIKI, R. K., GELFAND, D. H., STOFFEL, S., et al.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science **239**, 487–491 (1988).
12. ROLFS, A., SCHUMACHER, H. C.: Uncommon CSF-findings within the scope of HIV-I-seroconversion – hints for primary intrathecal immunreaction. New Engl. J. Med. **323**, 418–419 (1990).

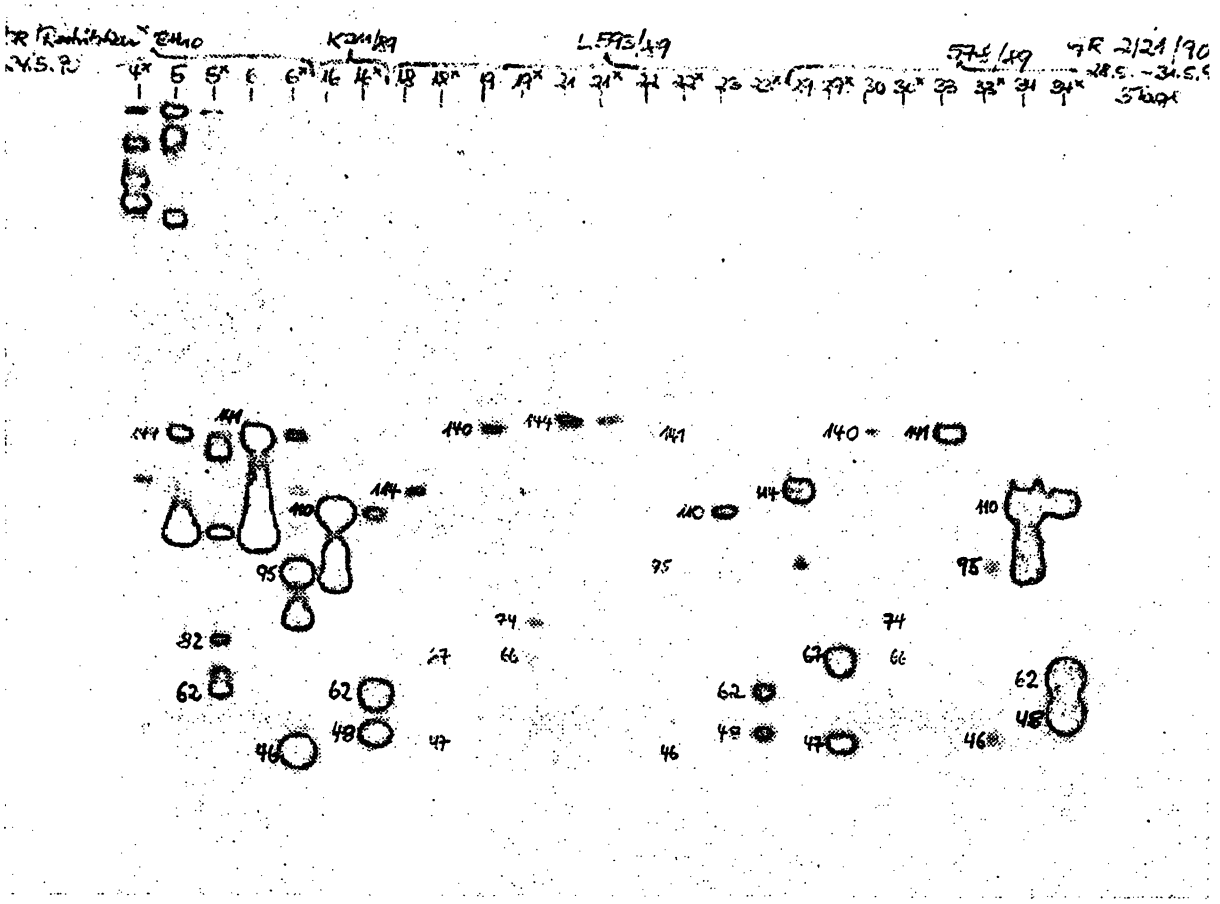

Abb. 1: Darstellung verschiedener radioaktiv markierter HIV-I-spezifischer PCR-Amplifikate nach Trennung in einem 6% Harnstoff-Polyacrylamid-Gel.

*Die mit * markierten Spuren stellen den zur PCR-Probe (ohne *) korrespondierenden Restriktionsansatz dar. Spur 4*–6* BH10-Klon (Positivkontrolle), 16–16* β-Globin-Kontrolle, 18–23* Liquor cerebrospinalis DNS eines HIV-I-positiven Patienten, 29–34* korrespondierende Blutprobe. Spur 5, 21 Amplifikation der CPE-Region, 144bp Amplifikat. Spur 6, 22, 33 env-Region, 141 bp Amplifikat. Spur 16, 23, 31 β-Globin-Kontrollregion, 110 bp Amplifikat. Spur 18, 29 gag-Region, 118 bp Amplifikat. Spur 19, 30 NRO-Region, 140bp Amplifikat. Durch den Restriktionsansatz entstehen im positiven Fall zwei Fragmente: 144bp > 82 bp + 62 bp/141bp >95 bp + 46 bp/110 bp > 62 bp + 48bp/114bp > 67bp + 47 bp/140bp > 74 bp + 66 bp. Die β-Globin-Region ist eine interne Kontrolle, um die Intaktheit der benutzten Patienten-DNS zu demonstrieren.*

13. ROUAH, E., ROGERS, B. B., WILSON, D. R., et al.: Demonstration of Epstein Barr virus in primary central nervous system lymphomas by the polymerase chain reaction and in situ hybridization. Hum. Pathol. 21, 545–550 (1990).
14. GODEC, M. S., ASHER, D. M., SWOVELAND, P. T., et al.: Detection of measles virus genomic sequences in SSPE brain tissue by the polymerase chain reaction. J. Med. Virol. 30, 237–244 (1990).
15. HOLLIMAN, R. E., JOHNSON, J. D., SAVVA, D.: Diagnosis of cerebral toxoplasmosis in association with AIDS using the polymerase chain reaction. Scand J. Infect Dis. 22, 243–244 (1990).
16. SAVVA, D., MORRIS, J. C., JOHNSON, J. D., et al.: Polymerase chain reaction for detection of Toxoplasma gondii. J. Med. Microbiol. 32, 25–31 (1990).
17. KITAMURA, K., NEWMAN, S. L., CAMPAGNONI, C. W., et al.: Expression of a novel transcript of the myelin basic protein gene. J. Neurochem. 54, 2032–2041 (1990).
18. MAISONPIERRE, P. C., BELLUSCIO, L., SQUINTO, S., et al.: Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. Science 247, 1446–1451 (1990).
19. WESSELINGH, S. L., GOUGH, N. M., FINLAY-JONES, J. J., et al.: Detection of cytokine mRNA in astrocyte cultures using the polymerase chain reaction. Lymphokine Res. 9, 177–185 (1990).
20. OKSENBERG, J. R., STUART, S., BEGOVICH, A. B., et al.: Limited heterogeneity of rearranged T-cell receptor V alpha transcripts in brains of multiple sclerosis patients. Nature 345, 344–346 (1990).

Anschrift der Verfasser:

Dr. Arndt Rolfs
Abteilung für Neurologie
(Direktor: Prof. Dr. P. Marx)
Neurochemisches Forschungslabor
(Leiter: Dr. A. Rolfs) im Klinikum Steglitz
Freie Universität Berlin
Hindenburgdamm 30
1000 Berlin 45

Dr. Hermann Christian Schumacher
Neurochemisches Forschungslabor
(Leiter Dr. A. Rolfs) im Klinikum Steglitz

Dipl.-Biol. Andreas Ney
Neurochemisches Forschungslabor
(Leiter Dr. A. Rolfs) im Klinikum Steglitz

Mathias Vallée
Neurochemisches Forschungslabor
(Leiter Dr. A. Rolfs) im Klinikum Steglitz

Ines Weber
Neurochemisches Forschungslabor
(Leiter Dr. A. Rolfs) im Klinikum Steglitz

Mirjana Würdemann
Neurochemisches Forschungslabor
(Leiter Dr. A. Rolfs) im Klinikum Steglitz

Barbara Trampenau
Neurochemisches Forschungslabor
(Leiter Dr. A. Rolfs) im Klinikum Steglitz