

Aus dem Bereich Klinische Medizin – Transplantations- und Infektionsimmunologie  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar  
(Leitung: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Martina Sester)

**Die BK Virus-spezifische zelluläre Immunantwort  
verändert sich altersabhängig und wird durch die Dynamik  
der viralen Replikation nachhaltig beeinflusst**

*Dissertation zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Medizin*

**der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2014

vorgelegt von: Claudia Ruth Adam,  
geb. am 23. Dezember 1982 in Gera

---

*Meiner Familie gewidmet.*

---

# Inhalt

1	Zusammenfassung.....	5
2	Einleitung .....	9
2.1	Die Familie der Polyomaviridae.....	9
2.2	Das BK Virus – Polyomavirus hominis 1 .....	9
2.2.1	Primärinfektion, Latenzzeit und Reaktivierung.....	10
2.2.2	Übertragungswege .....	12
2.2.3	Durch BKV verursachte Krankheitsbilder .....	12
2.3	Die Polyomavirus-assoziierte Nephropathie (PVN) .....	14
2.3.1	Risikofaktoren der Entwicklung einer PVN .....	14
2.3.2	Diagnostik der PVN.....	15
2.3.3	Therapie der PVN .....	15
2.3.4	Diagnostische Prävention PV-assoziiierter Komplikationen.....	16
2.4	Überblick: Das menschliche Immunsystem .....	19
2.4.1	Die zelluläre Immunabwehr .....	20
2.4.2	Das immunologische Gedächtnis .....	25
2.5	Ziel dieser Arbeit.....	26
3	Material und Methodik.....	28
3.1	Geräte und Materialien.....	28
3.2	Messmethode Durchflusszytometrie .....	30
3.3	Quantifizierung Antigen-spezifischer T Zellen aus Vollblut .....	32
3.3.1	Die verwendeten Antigene .....	33
3.3.2	Die Durchführung .....	34
3.4	Proliferations-Assay .....	38
3.4.1	Isolierung von PBMCs über Ficoll-Gradienten.....	38
3.4.2	Markierung der PBMCs mit CFSE .....	39
3.4.3	Stimulation CFSE-markierter Proben .....	40
3.4.4	Ernte und Färbung CFSE-markierter stimulierter Proben .....	40
3.4.5	Durchflusszytometrische Messung und deren Auswertung nach der Zellkultur .....	41

---

3.5	Bestimmung des BKV-spezifischen Serostatus.....	42
3.6	Patienten und Probandenkollektiv.....	43
3.7	Nachweiskriterien einer manifesten BKV-Reaktivierung.....	44
3.8	Statistische Analysen.....	45
3.9	Software.....	45
4	Ergebnisse.....	46
4.1	Durchflusszytometrischer Nachweis der BKV-spezifischen Immunität: errechneter Grenzwert IFN $\gamma$ -produzierender CD69 positiver CD4 T Zellen.....	48
4.2	Altersabhängigkeit der BKV-spezifischen Immunantwort.....	49
4.2.1	Quantitative Analyse reaktiver CD4 T Zellen und Antikörpertiter.....	49
4.2.2	Funktionalität der detektierbaren reaktiven CD4 T Zellen.....	52
4.3	Risikoadaptierte Analyse der BKV-spezifischen Immunantwort.....	55
4.3.1	Quantitative Analyse reaktiver CD4 T Zellen und Antikörpertiter.....	55
4.3.2	Funktionalität der detektierbaren reaktiven CD4 T Zellen bei Risikokollektiven.....	57
5	Diskussion.....	61
6	Literaturverzeichnis.....	67
7	Publikationen.....	74
7.1	Manuskript.....	74
7.2	Kongressbeiträge.....	74
7.3	Auszeichnung.....	75
8	Danksagung.....	76
9	Lebenslauf.....	77
10	Eidesstattliche Erklärung.....	78
11	Abkürzungsverzeichnis, alphabetisch.....	79

---

## 1 Zusammenfassung

Im Rahmen einer BK Virus (BKV)-Reaktivierung kann es bei Nierentransplantatempfängern unter medikamentöser Immunsuppression zu BKV-assoziierten Komplikationen kommen, am häufigsten in Form einer Transplantatnephropathie, welche zu einem Transplantatverlust führen kann.

Die BKV-Infektion ist weit verbreitet und tritt meist bereits in der Kindheit erstmals und typischerweise asymptomatisch auf. Sie erreicht eine Virus-spezifische Seroprävalenz in der Allgemeinbevölkerung von über 90%.

Hinsichtlich der BKV-spezifischen Immunität bei Kindern und Erwachsenen sowie ihrer Bedeutung für Virusreplikation und -assoziierte Komplikationen nach einer Transplantation ist noch immer wenig bekannt. Man weiß jedoch, dass Antigen-spezifische T Zellantworten oftmals besser als Antikörper mit der Intensität der Pathogenreplikation und deren Dynamik korrelieren. Daher untersuchten wir zum einen die Altersabhängigkeit der BKV-spezifischen zellulären Immunität bei 122 immungesunden Probanden (Alter 1-84 Jahre), 38 Nierentransplantatempfängern (RTx, mittleres Alter  $55,20 \pm 14,89$  Jahre; 14 RTx-BKVpos, 24 RTx-BKVneg) und 25 Hämodialysepatienten (HD, mittleres Alter  $61,34 \pm 17,95$  Jahre, Prätransplantations-Kontrollen) hinsichtlich möglicher Veränderungen der T zellulären Immunität im Zusammenhang mit BKV-assoziierten Komplikationen.

Sämtliche gewonnene Vollblutproben wurden mit überlappenden Peptiden von BKV-Large T- und VP1-Antigen stimuliert und anschließend durchflusszytometrisch auf intrazellulär akkumulierte Zytokine (IFN $\gamma$ , IL-2 und TNF $\alpha$ ) untersucht. Die Proliferationsaktivität der spezifischen T Zellen wurde anhand der abnehmenden Fluoreszenzintensität des intrazellulären Fluoreszenzfarbstoffs CFSE ermittelt. Gleichzeitig wurden gegen BKV gerichtete Antikörpertiter im Serum mithilfe eines VLP-basierten ELISA bestimmt.

Die gemessenen mittleren Frequenzen BKV-spezifischer CD4 T Zellen waren altersabhängig ( $p = 0,006$ ) mit den höchsten Frequenzen innerhalb der Altersgruppe der 20- bis 30-jährigen gesunden Kontrollen. 68,4% der untersuchten Personen in dieser Altersgruppe zeigten eine positive BKV-spezifische zelluläre Immunantwort. Diese Zusammenhänge ließen sich auch hinsichtlich der Proliferationsaktivität BKV-spezifischer T Zellen sowie entsprechender IgG-Antikörpertiter nachweisen. Alle 19

---

untersuchten Serumproben von Probanden zwischen 20 und 30 Jahren zeigten messbare BKV-spezifische Antikörpertiter. Des Weiteren wiesen Nierentransplantatempfänger mit 57,9% eine statistisch signifikant höhere Prävalenz BKV-spezifischer T Zellantworten auf als Alters-angepasste gesunde Kontrollpersonen (21,7%) oder Hämodialysepatienten (28%) ( $p = 0,017$ ). Bei Organempfängern mit einer in der Vergangenheit nachweisbaren BK virämischen Phase nach der Transplantation waren die mittleren Frequenzen BKV-spezifischer T Zellen ( $p = 0,001$ ) und auch die quantitativen IgG-Antikörpertiter ( $p = 0,027$ ) signifikant höher als bei transplantierten Probanden ohne vorangehend messbare Virusbelastung. Nierentransplantierte mit stattgehabter relevanter BK Virusproblematik haben mit  $43,92 \pm 17,59\%$  den im Mittel geringsten Anteil multifunktionaler spezifischer CD4 T Zellen (diese produzieren die Zytokine IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  und IL-2 simultan) an der CD4 T Zellgesamtpopulation im Vergleich zu den anderen untersuchten Alters-angepassten Kollektiven ( $p = 0,011$ ).

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich die BKV-spezifische T zelluläre Immunität mit einer altersabhängigen Dynamik verändert und dabei bereits im jungen Erwachsenenalter hochprävalent ist. Das Vorhandensein einer positiven BKV-spezifischen Immunantwort markiert Phasen der aktiven Virusreplikation. In der Ermittlung BKV-spezifischer T Zellfrequenzen und der zusätzlichen Charakterisierung ihres Funktionalitätsprofils findet sich möglicherweise eine Option der Identifizierung von Risikopatienten hinsichtlich der Entwicklung BKV-assoziiierter Komplikationen unter iatrogenen Immunsuppression.

---

## Summary

Renal transplant recipients under medicamentous immunosuppression are at risk of developing BK virus-associated complications, most frequently in terms of graft nephropathy possibly leading to a graft loss.

BK virus infection is widespread and typically asymptomatic during childhood. It achieves a virus-specific seroprevalence of more than 90 percent in the general population.

There is only limited knowledge on BK virus-specific immunity in children and adults as well as its role in viral replication and disease posttransplant. Though, it is known that antigen-specific T cell responses often correlate more closely than antibodies to the intensity and dynamic of pathogen replication activity.

Therefore we performed age-dependent analyses of BK virus-specific T cell immunity among 122 healthy individuals (aged 1-84), 38 renal transplant recipients (RTx, mean age  $55,20 \pm 14,89$  years; 14 RTx-BKVpos, 24 RTx-BKVneg) and 25 hemodialysis patients (HD, mean age  $61,34 \pm 17,95$  years, pre-transplant controls) in respect to possible changes in their T cellular responses to BK virus-associated complications.

All whole blood samples were stimulated with overlapping peptides of BK virus large T- and VP1-antigen followed by flow cytometric analyses of T intracellular accumulated cytokines (IFN $\gamma$ , IL-2 and TNF $\alpha$ ). Proliferation activity of the specific T cells was measured by diminishing intensity of intracellular fluorescent dye CFSE. Plasmatic BK virus-specific antibody titers were determined with the aid of VLP-based ELISA.

The detectable mean frequencies of BKV-specific CD4 T cells were age-dependent ( $p = 0,006$ ) with maximum levels in young adults between 20 and 30 years. 68,4% of the tested persons within this age group had a positive BK virus-specific cellular immune response. BK virus specific T cell proliferation and respective IgG-antibody titers showed an equal relationship: within all the 19 analyzed blood samples of healthy individuals aged 20 until 30 years BK virus-specific antibody titers were detectable.

In addition, we found a significant higher prevalence of BK virus-specific T cell responses in renal transplant recipients (57,9%) in contrast to age-matched healthy

---

controls (21,7%) or hemodialysis patients (28%) ( $p = 0,017$ ). Solid organ recipients with a BK viremic period after transplantation showed significant higher median frequencies of BK virus-specific T cells ( $p = 0,001$ ) as well as quantitative IgG-antibody titers ( $p = 0,027$ ) in contrast to transplant recipients without detectable viral load after transplantation.

Renal transplant recipients with relevant BK viremia show with about  $43,92 \pm 17,59\%$  the least fraction of multifunctional specific CD4 T cells producing the cytokines IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  and IL-2 simultaneously in comparison to the other age-matched collectives ( $p = 0,011$ ).

In conclusion we could demonstrate, that the BK virus-specific T cellular immunity varies age-dependently and is highly prevalent already in young adults. Detectable BK virus-specific immune responses assign phases of active virus replication. The detection of BK virus-specific T cell frequencies and the additional characterization of its functional cytokine profiles may help to identify patients at risk for developing BK virus-associated complications due to iatrogenic immunosuppression.

---

## **2 Einleitung**

### **2.1 Die Familie der Polyomaviridae**

Die Familie der Polyomaviridae umfasst kleine, hüllenlose Viruspartikel mit zirkulärer Doppelstrang-DNA mit einer Größe von 4800 bis 5500 Basenpaaren. Sie wurden ursprünglich mit den ähnliche molekulare Charakteristika besitzenden Papillomaviren in der Familie der Papovaviridae zusammengefasst. Heute werden die Polyoma- und Papillomaviren aufgrund von in den letzten Jahren entdeckten deutlichen Unterschieden im Aufbau des Genoms, in den Replikationsvorgängen und der Molekularbiologie in getrennte Virusfamilien eingeteilt (MODROW et al., 2010). Das kovalent geschlossene, zirkuläre Genom der Polyomaviridae kodiert unter anderem für fünf Hauptproteine, welche nach dem Zeitpunkt ihrer Genexpression in frühe sowie späte Virusantigene eingeteilt werden. Die durch den frühen Genomabschnitt kodierten, nach ihrer Größe beziehungsweise ihrem Molekulargewicht benannten Tumor-Antigene small t- (174 Aminosäuren/ca. 20 kD) und Large T-Antigen (708 Aminosäuren/ca. 90 kD), sind multifunktionale Regulationsproteine. Die restlichen drei später kodierten Virusproteine (VP)1, VP2 und VP3 formen als Strukturproteine zusammen die für Polyomaviren (PV) typische Ikosaederstruktur der Viruskapside (MODROW et al., 2010; MES et al., 2010).

Im Jahr 1953 wurde mit dem Mauspolyomavirus der erste Vertreter der Familie der Polyomaviridae entdeckt und seine, viele Organe betreffende, tumorerzeugenden Eigenschaften beschrieben, woraus sich die Bezeichnung „polyoma“ ableitet (MODROW et al., 2010).

### **2.2 Das BK Virus – Polyomavirus hominis 1**

Das zur Familie der Polyomaviridae gehörende, selektiv humanpathogene BK Virus (BKV) konnte im Jahr 1971 erstmalig aus dem Urin eines immunsuppressiv behandelten sudanesischen Nierentransplantatempfängers isoliert und beschrieben werden (GARDNER et al., 1971). Dieser trug die Initialen B.K. und zeigte dreieinhalb Monate nach der Transplantation eine klinisch relevante Ureterstenose. Die Ureterstenose ist als mögliche BKV-assoziierte Komplikation nach Nierentransplantation in der aktuellen Literatur mehrfach beschrieben (CHANG et al., 2005; RAJPOOT et al., 2007; KHAN et al., 2011).

---

Innerhalb der Gattung der SV40-ähnlichen Viren (Familie Polyomaviridae), zu denen das BKV gezählt wird, ist ebenso für das JC, das KI und das WU Virus der Mensch als selektive Wirtsspezies identifiziert. Gleiches gilt für das der Gattung Polyomavirus angehörende Merkel-Zell- sowie für das erst vor kurzem identifizierte Trichodysplasia spinulosa-assoziierte Polyomavirus (HIRSCH, RANDHAWA, 2009; SHARP et al., 2009; VAN DER MEIJDEN et al., 2010).

BK Viruskapside messen 42 nm im Durchmesser und zeigen sich sehr resistent gegen äußere Umwelteinflüsse (BOFILL-MAS et al., 2001). Das zirkuläre Genom umfasst 5130 Basenpaare und enthält unter anderem eine nicht-kodierende Kontrollregion (NCCR). Durch diese wird die Expression der im Uhrzeigersinn kodierten frühen Tumorantigene Large T- und small t-Antigen sowie der gegenläufig kodierten späten Kapsidstrukturproteine VP1, VP2, VP3 und dem Agnoprotein reguliert (HIRSCH, STEIGER, 2003). Das Large T-Antigen und VP1 sind die in der heutigen Laboratoriumsdiagnostik am häufigsten eingesetzten Antigene für qualitative und quantitative Analysen der gegen BKV gerichteten zellulären Immunantwort. Das Large T-Antigen wirkt hauptsächlich im Zellkern. Es dient unter anderem der Virusreplikation sowie der Regulation der zellulären Onkogenität. Damit beeinflusst und steuert es zelluläre Erkennungsprozesse durch Veränderung und Anpassung der exprimierten viralen Oberflächenproteine (PURIGHALLA et al., 1995; HIRSCH, STEIGER, 2003; COMOLI et al., 2004; WEINREB et al., 2006; BINGGELI et al., 2007; CHEN et al., 2008; COMOLI et al., 2008; GOSERT et al., 2008; LUO et al., 2008; BODAGHI et al., 2009). Durch das Hauptkapsidprotein VP1 hingegen werden die unterschiedlichen BKV-Serotypen geformt. Es beeinflusst interzelluläre Rezeptor-assoziierte Erkennungsprozesse und ist in der Lage, BKV-spezifische Antikörper zu neutralisieren. Damit kann es die gegen BKV gerichtete humorale und auch zelluläre Immunantwort modifizieren (SHAH et al., 1973; JIN et al., 1993; RANDHAWA et al., 2002; KNOWLES et al., 2003; RANDHAWA et al., 2006; LUO et al., 2008; RANDHAWA et al., 2009).

### **2.2.1 Primärinfektion, Latenzzeit und Reaktivierung**

Nach vorwiegend im Kindesalter erfolgreicher, meist mild (mit leichtem Fieber und/oder unspezifischer Infektion der oberen Atemwege) bis asymptomatisch verlaufender Primärinfektion persistieren BK Viruspartikel u.a. in lymphatischen Geweben, mononukleären Zellen des peripheren Blutes (peripheral blood

---

mononuclear cells, PBMCs) sowie in proximalen Nierentubuluszellen. Die Primärinfektion ist gekennzeichnet durch die Bildung von stark kreuzreaktiven IgM- und IgG-Antikörpern gegen virale VP1-Proteine im Rahmen einer Aktivierung der humoralen Immunantwort (MODROW et al., 2010). Ein positiver anti-BKV-Serostatus mit gegen BKV gerichteten IgG-Antikörpern ist bei mehr als 90% der Kinder, Jugendlichen und jungen Erwachsenen und auch bei mehr als 80% der Erwachsenen weltweit zu beobachten (KNOWLES et al., 2003; EGLI et al., 2009a). Nieren, Lungen, Augen, Leber und Gehirn sind dabei mögliche Manifestationsorgane, sowohl im Rahmen der Primärinfektion als auch einer mit zeitlicher Latenz auftretenden Virusreaktivierung (REPLOEG et al., 2001). In diesem Zusammenhang gibt es bis heute in der Literatur, trotz seiner Zugehörigkeit zur Familie der Polyomaviridae, keine Hinweise auf eine Fähigkeit des Virus zur Auslösung von Tumorerkrankungen. Die Nieren und die ableitenden Harnwege gelten sowohl bei gesunden, immunkompetenten Personen als auch bei Personen mit endogener (z.B. Antikörpermangelsyndrome, Niereninsuffizienz, Diabetes mellitus) und/oder iatrogen bedingter Immundefizienz (z.B. medikamentöse Immunsuppression nach Organ-/Gewebetransplantation oder im Rahmen einer Chemotherapie) als Hauptort der Viruslatenz. Diese Latenz geht einher mit einer fehlenden oder relativ geringen Virusreplikation sowie intermittierenden Virusausscheidung im Urin (Virurie) (CHESTERS et al., 1983; REPLOEG et al., 2001; DRACHENBERG et al., 2007). Bei bis zu 10% der gesunden, seropositiven Personen konnte eine Virusreaktivierung mit niedriger, asymptomatischer BKV-Ausscheidung im Urin gemessen werden (EGLI et al., 2009b). Die Inzidenz der BK Virurie nimmt mit zunehmendem Alter der gemessenen Personen zu und erreicht mit 44% ein Maximum in der Gruppe der über 80-jährigen (YOGO et al., 2009). Bei immunsupprimierten Personen, wie z.B. Empfängern solider Organe, sind dagegen regelhaft hohe BKV-Replikationslevel und eine wesentlich höhere Viruslast im Urin nachweisbar (HIRSCH et al., 2002; BRENNAN et al., 2005; FUNK et al., 2008). Bei Nierentransplantatempfängern entsteht eine BKV-Reaktivierung am häufigsten in den Tubulusepithelzellen des Spenderorgans, woraufhin sich das Virus in den urothelialen Epithelschichten vermehrt und zu Virus-assoziierten Komplikationen beim Empfänger führen kann (NICKELEIT et al., 1999; BOHL et al., 2005; FUNK et al., 2008). Mögliche Symptome können bei Immunsupprimierten von einer beschwerdefreien Hämaturie bis hin zu einer hämorrhagischen Zystitis reichen

---

(REPLOEG et al., 2001), welche am häufigsten durch eine BKV-Infektion verursacht wird (APPERLEY et al., 1987; GODDARD, SAHA, 1997; VOGELI et al., 1999). Man konnte dabei sogar einen antiproportionalen Zusammenhang zwischen der Prävalenz einer BK Virurie und der CD4 T Zellzahl beobachten (DEGENER et al., 1997). Im peripheren Blut sind zirkulierende BK Viruspartikel ausschließlich während Phasen der Reaktivierung messbar und nicht in Phasen der Viruslatenz (DOLEI et al., 2000). Latentes BKV ist dabei vorrangig in Leukozyten, Zellen des Bindegewebes, des Uroepithels, von Endothelien sowie in Ependymzellen und Astrozyten des Gehirns nachweisbar (SHINOHARA et al., 1993; DORRIES, 1998).

### **2.2.2 Übertragungswege**

Als hauptsächlichster interindividueller Übertragungsweg gilt bis heute die fäkal-respiratorische Schmierinfektion mit virusbelastetem Urin. Daneben gibt es jedoch auch Hinweise auf eine Vermehrung von Viruspartikeln im Speichel und eine damit verbundene orale Übertragung (JEFFERS et al., 2009). Auch eine mögliche sexuelle Übertragung durch virusbelastete Genitalsekrete und/oder Sperma ist beschrieben (PETERMAN et al., 1993; MONINI et al., 1996). Da die Primärinfektion mit dem BK Virus oftmals vor Beginn des Lebensalters mit sexuellen Aktivitäten eintritt, führt der genitale Übertragungsweg häufiger zu einer Virusreaktivierung nach der Primärinfektion im frühen Kindesalter (MONINI et al., 1996). Auch eine vertikale Übertragung des Virus von der Mutter auf ihr ungeborenes Kind wurde in der Literatur beschrieben (BOLDORINI et al., 2011). Schwangere zeigen zum Schutz vor einer Abstoßung des potentiell immunogenen Embryos/Fetus eine gewisse Schwächung ihres Immunsystems für den Zeitraum der Schwangerschaft. Aus diesem Grund ist bei zirka 50% der schwangeren Frauen eine milde Virusreaktivierung und Ausscheidung von Viruspartikeln mit dem Urin zu beobachten (CHANG et al., 1996). Diese Virusreaktivierung lässt sich zu einem gewissen Anteil auch bei Diabetespatienten nachweisen (KAHAN et al., 1980).

### **2.2.3 Durch BKV verursachte Krankheitsbilder**

Die klinisch bedeutsamsten BKV-induzierten Krankheitsbilder unter endogener oder iatrogenen Immunsuppression sind die PV-assoziierte Nephropathie (PVN) sowie die PV-assoziierte hämorrhagische Zystitis (PVHZ) (HIRSCH, RANDHAWA, 2009). Dabei treten mit einem Anteil von 1-10% die meisten Fälle von PVN bei

---

Nierentransplantatempfängern auf, wohingegen die PVHZ mit einem Anteil von 5-15% häufiger bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation beobachtet werden kann (HIRSCH, STEIGER, 2003; DROPULIC, JONES, 2008).

Man geht davon aus, dass ungefähr 30-50% der Nierentransplantatempfänger mit starker Virurie eine Virämie (im Blut nachweisbare BK Viruspartikel) mit daraus resultierender klinisch manifester PVN entwickeln (NICKELEIT et al., 2000; HIRSCH et al., 2002; DRACHENBERG et al., 2007; VISCOUNT et al., 2007). Ein möglicherweise durch die medikamentöse Immunsuppression mitbedingtes Ungleichgewicht zwischen Viruslast und BKV-spezifischer Immunabwehr wird dabei als ein ausschlaggebender Faktor angesehen (HIRSCH, RANDHAWA, 2009).

Daneben kann das BKV auch Auslöser zahlreicher weiterer Komplikationen sein, wie zum Beispiel Ureterstenosen, Pneumonitiden, hämophagozytischen Syndromen, Enzephalitiden, Retinitiden, Multiorganversagen und auch der Polyomavirus-assoziierten multifokalen Leukenzephalopathie (HIRSCH, RANDHAWA, 2009). Letztere wird jedoch häufiger durch das JC Polyomavirus verursacht (CROWDER et al., 2005).

Seit den 1990er Jahren konnte eine zunehmende Inzidenz der Replikationsrate der PV sowohl im Urin als auch im peripheren Blut von Nierentransplantatempfängern beobachtet werden. In vielen Fällen resultierte diese in einer PV-assoziierten Nephropathie mit konsekutiver Transplantatfunktionsverschlechterung und vorzeitigem Transplantatverlust in über 50% der Fälle. In diesen Fällen entwickelte sich die PVN mehrere Wochen nach der Progression einer BK Virurie zur kombinierten Virurie und Virämie. Histologisch handelte es sich dabei am häufigsten um eine tubulointerstitielle Nephritis (PURIGHALLA et al., 1995; MATHUR et al., 1997; RANDHAWA et al., 1999; DRACHENBERG et al., 2007). Als maßgeblicher Hauptrisikofaktor der Ausbildung einer PVN gilt weiterhin die intensivierete iatrogene Immunsuppression (HIRSCH, 2002; COMOLI et al., 2006).

Mit den ständig weiterentwickelten und damit verbesserten Untersuchungsmethoden zur Früherkennung einer beginnenden Virusvermehrung konnte das Auftreten BKV-assoziiierter Gewebeschäden an renalen Spenderorganen deutlich verringert und die damit verbundene Abstoßungsrate auf 10% und weniger gesenkt werden (DRACHENBERG et al., 2004c; WADEI et al., 2006).

---

## **2.3 Die Polyomavirus-assoziierte Nephropathie (PVN)**

### **2.3.1 Risikofaktoren der Entwicklung einer PVN**

Die Tatsache, dass eine BKV-assoziierte Nephropathie um vieles häufiger nach Nierentransplantation als nach der Transplantation anderer solider Organe auftritt, deutet auf den mehrfach in der Literatur beschriebenen Zusammenhang mit der Präferenz renalen Gewebes für die Latenz dieses Polyomavirus hin (HIRSCH, RANDHAWA, 2009). Neben der BKV-Belastung des transplantierten Spenderorgans werden auch Faktoren wie eine mögliche Virusreaktivierung durch eine Gewebeverletzung aufgrund der präoperativen Ischämie angesehen. Als ein Hauptrisikofaktor gilt zudem ein qualitatives und quantitatives Missverhältnis zwischen der BKV-Last und der spezifischen T zellulären Empfängerimmunabwehr (COMOLI et al., 2004; COMOLI et al., 2006; COMOLI et al., 2008; HIRSCH, RANDHAWA, 2009).

Je nach betrachtetem Transplantationszentrum und den entsprechenden Studiencharakteristika sind als weitere Risikofaktoren der Entwicklung einer PVN durch den Organempfänger unter anderem diverse Spendereigenschaften wie zum Beispiel das weibliche Geschlecht, die Leichennieren- im Vergleich zur Lebendnierenspende, ein nachweisbarer Reperfusionsgewebeschaden des Spenderorgans, hohe BKV-spezifische Antikörpertiter als Hinweis auf zurückliegende Virusbelastungen und auch die Anzahl der HLA-Missmatches mit dem Empfänger zu nennen. Auch bestimmte Charakteristika des Organempfängers, wie ein hohes Lebensalter zum Zeitpunkt der Transplantation, das männliche Geschlecht und eine geringe oder fehlende BKV-spezifische T zelluläre Immunabwehr, können das Risiko des Auftretens BKV-assoziiierter Komplikationen nach der Transplantation deutlich erhöhen (HIRSCH et al., 2005; HIRSCH, RANDHAWA, 2009).

Als weitere relevante Faktoren nach der Transplantation werden die akute Abstoßung (im Zeitraum von wenigen Tagen nach der Transplantation) und das dadurch notwendige eskalierte immunsuppressive Therapieregime, die Höhe der kumulativen Steroiddosis, die Gabe Lymphozyten-depletierender Antikörper und hohe Immunsuppressiva-Serumspiegel beschrieben. Dabei konnten insbesondere Calcineurininhibitoren in Kombinationsregimes (Tacrolimus risikobehafteter hinsichtlich einer PVN als Cyclosporin A) im Vergleich zu mTOR-Inhibitoren als zusätzlicher negativer Einflussfaktor identifiziert werden (HIRSCH et al., 2002;

---

HIRSCH et al., 2005; DHARNIDHARKA et al., 2009; HIRSCH, RANDHAWA, 2009; MANITPISITKUL et al., 2009; PRINCE et al., 2009; SCHOLD et al., 2009).

### **2.3.2 Diagnostik der PVN**

Die klinischen Hinweise auf die Entwicklung einer PVN sind weder eindeutig noch einheitlich. Meist zeigt sich ein Wiederanstieg des Serumkreatinins nach der initialen posttransplantationalen Phase fallender renaler Retentionswerte. Das histologische Korrelat dieses Serumkreatininanstiegs bildet die zunehmende Transplantatgewebeverletzung durch aggressive Virus-induzierte Zerstörung epithelialer Tubuluszellen und der damit einhergehenden Entzündungsreaktion (NICKELEIT et al., 1999; DRACHENBERG et al., 2001; BUEHRIG et al., 2003; DRACHENBERG et al., 2004b).

Diagnostisches Mittel der Wahl ist in diesem Zusammenhang die Transplantatbiopsie. Zum einen kann man das Virus im Transplantatgewebe durch Verwendung kreuzreaktiver Antikörper gegen BKV-Proteine wie das Large T-Antigen und das VP1 im Rahmen einer immunhistochemischen Untersuchung nachweisen, zum anderen den direkten Virusgenom-Nachweis durch eine in situ-Hybridisierung mit BKV-Nukleinsäuren führen. Dabei sollten bei der Organbiopsie mindestens zwei Gewebeproben entnommen werden um falsch negativen Ergebnissen aufgrund fokal-assymmetrischer virusinduzierter Organveränderungen vorzubeugen. Diese konnten in 10-30% der veröffentlichten Biopsieuntersuchungen gezeigt werden (DRACHENBERG et al., 2004b).

### **2.3.3 Therapie der PVN**

Die Therapie gesicherter BKV-assoziiierter Komplikationen nach Nierentransplantation bei Patienten ohne klinische Zeichen einer resultierenden akuten Abstoßungsreaktion und auch im Fall des Verdachts auf eine PVN ist die Reduktion der medikamentösen Immunsuppression, wodurch die körpereigene Viruselimination unterstützt werden soll (COMOLI et al., 2006; COMOLI et al., 2008). Die Diagnose „Verdacht auf das Vorliegen einer PVN“ wird gestellt, wenn klinische Zeichen auf das Vorliegen einer PVN hindeuten, diese durch mehrfach durchgeführte Transplantatgewebepbiopsien jedoch nicht bestätigt werden kann (HIRSCH, RANDHAWA, 2009).

---

Eine weitere therapeutische Option für Patienten mit konstant hoher Serumviruslast unter konsequent reduzierter oraler Immunsuppression ist die Gabe antiviraler Substanzen wie das intravenös verabreichte Nukleosid-Analogon Cidofovir oder der oral verfügbare Pyrimidin-Synthesehemmer Leflunomid. Die zusätzliche Applikation dieser Medikamente konnte jedoch in keiner bis heute veröffentlichten Studie als der alleinig verminderten Immunsuppression über einen längeren Zeitraum als überlegen in der Behandlung PV-assoziiertes Transplantatschäden gezeigt werden (HIRSCH, RANDHAWA, 2009).

### **2.3.4 Diagnostische Prävention PV-assoziiertes Komplikationen**

Es wird empfohlen, dass Nierentransplantatempfänger unabhängig von ihrem BKV-Risikoprofil beziehungsweise von dem Vorhandensein klinischer Hinweise auf das Vorliegen BKV-assoziiertes Komplikationen, in regelmäßigen Abständen hinsichtlich einer BK Virusreplikationsaktivität getestet werden. Bei unauffälligen Verläufen sollten in den ersten zwei Jahren nach der Transplantation in dreimonatigen Abständen Kontrollen erfolgen und in den darauffolgenden drei Jahren einmal jährlich (HIRSCH et al., 2005). Mehrere prospektive Beobachtungsstudien konnten zeigen, dass 20-40% der Nierentransplantatempfänger in den ersten zwei Jahren nach Transplantation eine hochgradige Virurie entwickeln (HIRSCH et al., 2002; DRACHENBERG et al., 2004a; BRENNAN et al., 2005; BRESSOLLETTE-BODIN et al., 2005; DRACHENBERG et al., 2007; GINEVRI et al., 2007; PANG et al., 2007; VISCOUNT et al., 2007). Die relativ großen Zeitintervalle von 3 Monaten orientieren sich an Untersuchungen, aus denen hervorgeht, dass die durchschnittliche Dauer bis zum Auftreten histologischer sowie funktioneller Veränderungen im Sinne einer PVN etwa 4-12 Wochen (Median 6 Wochen) nach der Diagnose BK Virurie beträgt (HIRSCH, RANDHAWA, 2009).

#### **2.3.4.1 Nachweis von BKV-Nukleinsäuren in Urin und Blutplasma**

Die PVN kann durch Urin-Untersuchungen auf BKV-Desoxyribonukleinsäuren (DNA) mit einem positiven prädiktiven Wert von mehr als 95% sicher identifiziert werden. Dabei eignet sich neben dem urinzytologischen Nachweis spezifischer sogenannter Decoy-Zellen auch eine quantitative Polymerasekettenreaktion (PCR) mit den Zielsequenzen BKV-DNA oder VP1-mRNA als gleichermaßen zuverlässiges Diagnoseverfahren (DRACHENBERG et al., 1999; NICKELEIT et al., 1999; DING,

---

SUTHANTHIRAN, 2003; HIRSCH et al., 2005; DRACHENBERG et al., 2007; VISCOUNT et al., 2007; YEO et al., 2008). Transplantatempfänger, welche in diesen Untersuchungen eine hohe Viruslast im Urin aufweisen, sollten zusätzlich auf das Vorhandensein von BKV-Genom im Blutplasma getestet werden. Diejenigen mit unter therapeutischen Konsequenzen (siehe Abschnitt 2.3.3) für mehr als drei Wochen persistierender hoher BK Viruslast im Blutplasma sollten mit der Indikation „Verdacht auf das Vorliegen einer PVN“ einer Nierenbiopsie zugeführt werden (HIRSCH et al., 2005). Dabei muss ein begleitender Anstieg renaler Retentionswerte für die Indikationsstellung nicht zwingend nachweisbar sein (HIRSCH, RANDHAWA, 2009).

#### **2.3.4.2 Nachweis von BKV-spezifischen Antikörpern**

Durch die Bestimmung BKV-spezifischer IgG-Antikörper kann sowohl bei Organspendern als auch -empfängern ein in der Vergangenheit stattgefundenener Kontakt mit BKV nachgewiesen werden. Es existieren jedoch keine standardisierten Untersuchungsmethoden zum Einsatz dieser Technik in der Transplantationsmedizin und so wird die routinemäßige Antikörperbestimmung vor der Transplantation und auch im Verlauf bei Spendern und Empfängern nicht empfohlen (HIRSCH, RANDHAWA, 2009).

Durch Verwendung verschiedener Nachweismethoden konnten abnehmende Antikörpertiter mit teilweiser Konversion zu einem wieder negativen BKV-spezifischen Serostatus bei älteren Menschen, chronischen Hämodialysepatienten mit terminaler Niereninsuffizienz sowie unter endogener oder iatrogener Immunsuppression beobachtet werden (KNOWLES et al., 2003; BODAGHI et al., 2009; EGLI et al., 2009a). Aus einer weiteren Untersuchung geht ein positiver Zusammenhang zwischen hohen BKV-spezifischen Spender-IgG-Titern unmittelbar vor der Organtransplantation und der Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer BK Virurie beim Empfänger im Vergleich zu BKV-seronegativen Spendern hervor (BOHL et al., 2005). Auch das Vorliegen niedriger oder nicht vorhandener BKV-spezifischer Antikörper beim Empfänger wird als relevanter Risikofaktor für die Entwicklung einer Virurie betrachtet (GINEVRI et al., 2003; SMITH et al., 2004; BOHL et al., 2005). Erklärt wird dieses mit der medikamentös unterdrückten Fähigkeit zur Bildung einer BKV-spezifischen IgA-Immunabwehr in der ersten Woche nach der Organtransplantation. Es wird in diesem Zeitraum des höchsten Risikos akuter

---

Abstoßungsreaktionen ein Kompromiss gebildet zwischen iatrogener Unterdrückung der endogenen Immunabwehr und dem Schutz vor einem Transplantatverlust (RANDHAWA et al., 2008). Innerhalb dieses Zeitraums nachweisbare IgG- und IgM-Fraktionen deuten zwar auf eine stattgehabte Exposition mit BKV hin, sind aber nicht an einer effektiven Virusabwehr beteiligt (ANDREWS et al., 1988; HARIHARAN et al., 2005; RANDHAWA et al., 2006; GINEVRI et al., 2007; LEUENBERGER et al., 2007; BOHL et al., 2008; RANDHAWA et al., 2008; BODAGHI et al., 2009). Generell ist die BKV-spezifische humorale Immunität nicht in der Lage, den Organempfänger solitär wirkend vor einer BK Virusreaktivierung und einer ggf. konsekutiven BKV-assoziierten Transplantatnephropathie zu schützen (BOGDANOVIC et al., 1998; HIRSCH et al., 2002).

#### **2.3.4.3 Bestimmung der BKV-spezifischen T zellulären Abwehr**

Eine weitere diagnostische Möglichkeit zur Abgrenzung PVN-gefährdeter Transplantatempfänger von denen mit geringerem Risiko ist die Bestimmung BKV-spezifischer T Zellen aus Vollblutproben. Dafür werden PBMCs des Organempfängers mit BKV-Antigenen, Einzelpeptiden oder Peptidmischen stimuliert und anschließend quantitativ, beispielsweise mittels Durchflusszytometrie oder „enzyme linked immunospot“ (Elispot) Assay, analysiert. Bis heute wurden dahingehend jedoch keine einheitlichen Nachweisgrenzen definiert, welche Empfänger mit einem hohen Risiko BKV-assoziiierter Komplikationen bis hin zur PVN von denen durch das eigene Immunsystem geschützten sicher unterscheiden (HIRSCH, RANDHAWA, 2009).

Des Weiteren hinderlich für die Etablierung dieses Verfahrens in der klinischen Routinediagnostik ist die Tatsache, dass die quantitative BKV-spezifische T Zell-Immunität nach Kurzzeitstimulation von PBMC generell ungefähr 10- bis 50-mal niedriger messbar ist als im Rahmen bereits etablierter Assays, beispielsweise für die Cytomegalie (CMV)- oder Epstein Barr Virus (EBV)-spezifische Immunantwort (HIRSCH, RANDHAWA, 2009).

Dahingehend konnte bisher lediglich gezeigt werden, dass Organempfänger nach überstandener BK Virämie und PVN eine signifikant höhere T zelluläre Immunabwehr zeigen als diejenigen mit persistierend hoher BK Viruslast im Serum (HIRSCH, RANDHAWA, 2009). Eine bessere Aussagekraft hat die Langzeitstimulation von PBMCs mit BKV-spezifischen Antigenen, welche jedoch in

---

der Akutsituation, in der oftmals ein direktes therapeutisches Eingreifen notwendig ist, von eher geringerer klinischer Relevanz sind (HIRSCH, RANDHAWA, 2009).

Aus diesen Gründen ist die standardmäßige Diagnostik der BKV-spezifischen Immunität bei Nierentransplantatspendern und -empfängern noch nicht etabliert (HIRSCH, RANDHAWA, 2009).

## **2.4 Überblick: Das menschliche Immunsystem**

Unter dem Begriff „Immunsystem“ wird das Zusammenspiel verschiedener Effektorzellen und Moleküle verstanden mit dem gemeinsamen Ziel, den menschlichen Organismus vor schädlichen äußeren und inneren Einflüssen, zum Beispiel durch Krankheitserreger, zu schützen. Hierzu muss es das Eindringen von Pathogenen beziehungsweise eine beginnende Infektion des Körpers erkennen (immunologische Erkennung) und daraufhin Immun-Effektorfunktionen zur Krankheitseindämmung und Erregerabwehr zeigen. Des Weiteren müssen immunregulatorische Komponenten und Fähigkeiten zur Selbst-Erkennung vorhanden sein um vor allem Angriffe gegen körpereigene Strukturen zu vermeiden. Letztendlich muss ein immunologisches Gedächtnis entwickelt werden können um im Fall einer erneuten Infektion mit einem bekannten Erreger die erforderlichen Abwehrmechanismen wirksamer und schneller in Gang zu setzen.

Der menschliche Körper besitzt auf der einen Seite chemische und physikalische Barrieren in Form von Haut und Schleimhäuten mit darin wirkenden Zellen sowie ein intrinsisches zelluläres Abwehrsystem in Form des programmierten Zelltods (Apoptose), auf der anderen Seite zwei miteinander in Wechselwirkung stehende Systeme aus Effektorzellen und deren Signalmolekülen: die sogenannte angeborene und die erworbene (adaptive) Immunabwehr (MURPHY, 2009).

Zur angeborenen Abwehr gehören unter anderem phagozytotische Zellen wie zum Beispiel die Makrophagen, welche innerhalb von Stunden nach Kontakt mit einem Pathogen reagieren, daneben Granulozyten und natürliche Killerzellen sowie humorale Komponenten wie das Komplementsystem (siehe unten), Lektine und Akutphase-Proteine.

Die Auslösung einer adaptiven Immunantwort bei Erstkontakt mit dem infektiösen Agens benötigt mehrere Tage und basiert hauptsächlich auf den B und T Lymphozyten (B und T Zellen) mit ihren hochgradig spezifischen Zelloberflächen-Antigen-

---

rezeptoren sowie deren Antikörpern (Immunglobuline, Ig) und Botenstoffen (Zytokine, Chemokine) (MURPHY, 2009).

## **2.4.1 Die zelluläre Immunabwehr**

### **2.4.1.1 Entstehung und Reifung**

Alle Zellen des Immunsystems gehen aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks hervor. Aus diesen entwickeln sich als direkte Vorläuferzellen der „weißen Blutzellen“ des Immunsystems die lymphatischen und die myeloiden Zelllinien.

Die gemeinsame myeloide Vorläuferzelle ist unter anderem die Vorstufe der Makrophagen, Granulozyten, Mastzellen und der dendritischen Zellen der angeborenen Immunabwehr. Makrophagen finden sich in fast allen Geweben des Körpers und sind die sich im Gewebe ausdifferenzierende Form der ständig im Blut zirkulierenden Monozyten. Monozyten und Granulozyten bilden zusammen mit den dendritischen Zellen die Gruppe der Phagozyten, die erste Barriere der angeborenen Immunität. Neben ihrer Funktion als sogenannte Fresszellen zur Beseitigung infizierter Zellen, toter Zellen und Zelltrümmer sezernieren sie auch Signalproteine, welche die Mitglieder der adaptiven Immunabwehr aktivieren und an den Ort der Entzündung, den Infektionsherd, locken. Eine dahingehend besondere Rolle in der Aktivierung von T Zellen spielen die dendritischen Zellen durch Präsentation von Erregerantigenen auf ihrer Zelloberfläche. Makrophagen sowie B Zellen gehören ebenfalls zu dieser Gruppe der antigenpräsentierenden Zellen (APZ), welche einen entscheidenden Verknüpfungspunkt zwischen angeborener und adaptiver Immunabwehr darstellen.

Aus der gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle im Knochenmark differenzieren sich die Lymphozyten. Zu diesem Zelltyp gehören zum einen die Natürlichen Killer- (NK) Zellen, welche Antigen-unspezifisch auf das Vorhandensein einer Infektion reagieren und deswegen der angeborenen Immunabwehr zugeordnet werden, zum anderen die hochgradig Antigen-spezifischen B und T Lymphozyten des adaptiven Immunsystems.

Im menschlichen Körper zirkulieren mit Blut und Lymphflüssigkeit zu jedem Zeitpunkt etwa 1 Milliarde Lymphozyten mit mindestens  $10^8$  unterschiedlich spezifischen Antigenrezeptoren. Aus diesen kann sich nach Kontakt mit dem entsprechenden

---

Antigen durch Zellvermehrung im Rahmen einer klonalen Expansion eine suffiziente Pathogenabwehr bilden.

Dieser Kontakt findet vorrangig in den sekundären lymphatischen Organen statt. Man unterscheidet die primären zentralen lymphatischen Organe Knochenmark und Thymus, in denen die Lymphozytenbildung stattfindet, von den sekundären peripheren lymphatischen Organen. Zu diesen gehören Lymphknoten, Milz und mukosale lymphatische Gewebe schleimhautausgekleideter Organe (zum Beispiel Darm, Atemwege, Urogenitaltrakt).

Lymphozyten, die noch nicht durch einen Antigenkontakt aktiviert wurden, bezeichnet man als naive B beziehungsweise T Lymphozyten. Erst nach Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen differenzieren sie sich zu funktionellen sogenannten Effektor-Lymphozyten und lösen damit die adaptive Immunantwort aus. Effektorlymphozyten sind zum einen die B Zellen, welche sich nach Bindung eines Antigens an ihren B Zellrezeptor (BZR) zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen entwickeln und zum anderen die T Zellen. Die T zelluläre Immunabwehr dient hauptsächlich der Bekämpfung intrazellulärer Krankheitserreger, unterstützt durch B zelluläre Antikörper, welche die sezernierte Form des BZR darstellen.

Im Unterschied zu den B Lymphozyten, welche im Knochenmark entstehen und auch dort heranreifen, wandern T Lymphozyten nach ihrer Bildung im Knochenmark in den Thymus um sich dort zu reifen naiven T Lymphozyten zu differenzieren.

Nach Abschluss des Reifeprozesses zirkulieren B und T Lymphozyten durch die peripheren (lymphatischen) Gewebe um auf ihr spezifisches Antigen zu treffen und dadurch aktiviert zu werden. Diese Aktivierung erfolgt nachdem zuvor ein Pathogen von einer dendritischen Zelle aufgenommen wurde und damit die adaptive Immunantwort eingeleitet wird. Dendritische Zellen besitzen, wie auch Makrophagen und Neutrophile, sogenannte Mustererkennungsrezeptoren für regelmäßig auf den Oberflächen von Krankheitserregern, nicht aber auf Wirtszellen, vorkommende Strukturen wie beispielsweise mannosereiche Oligosaccharide, Proteoglykane oder Lipopolysaccharide in der Bakterienzellwand.

---

### **2.4.1.2 Subgruppen der T zellulären Immunität**

#### **2.4.1.2.1 T zelluläre Ko-Rezeptoren und ko-stimulierende Signale**

Zur Präsentation von Fremdanigenen existieren zwei Klassen von major histocompatibility complex (MHC)-Molekülen, die anhand ihrer Funktion und den an sie bindenden T Zellarten unterschieden werden. Durch die MHC-Klasse-I-Moleküle (MHC-I) werden den CD8 T Zellen Peptidfragmente auf der Zielzelloberfläche präsentiert, welche aus Proteinen von sich im Cytosol vermehrenden Krankheitserregern stammen (zum Beispiel Viren). Alle kernhaltigen Körperzellen tragen MHC-I-Moleküle auf ihrer Oberfläche, sodass jede potentiell befallene Zelle zur Erregereindämmung eliminiert werden kann. MHC-Klasse-II-Moleküle (MHC-II), welche normalerweise nur auf aktivierungsfähigen Zellen in naivem oder aktiviertem Zustand exprimiert werden, präsentieren den CD4 T Zellen Peptide von Pathogenen, die sich in Makrophagenvesikeln vermehren oder durch dendritische Zellen bzw. B Zellen aufgenommen wurden.

Die in den meisten Geweben vorkommenden phagozytotisch aktiven dendritischen Zellen suchen, beladen mit Pathogenfragmenten auf ihren Zelloberflächen, periphere lymphatische Gewebe auf und präsentieren diese Antigene zusammen mit gleichzeitig exprimierten ko-stimulierenden Oberflächensignalmolekülen den dortigen T Lymphozyten. Nur durch das Zusammenwirken ihres spezifischen Antigens und des ko-stimulierenden Signals werden T Lymphozyten dazu angeregt, sich zu vermehren und zu Effektor-T Lymphozyten zu reifen. Auch die nachfolgende Sekretion verschiedener Zytokine und Effektormoleküle sowie die vermehrte Produktion von Aktivierungsmarkern, wie beispielsweise CD69, bedarf dieser dualen Stimulation.

Der Kontakt mit einem Antigen ohne das begleitende ko-stimulierende Molekül führt zur Inaktivierung naiver T Lymphozyten. In der Folge kommt es entweder zur klonalen Deletion oder aber die Zellen werden in den Zustand der Anergie versetzt, so dass trotz Reiz keine Immunantwort induziert wird. Dieser Mechanismus dient wiederum vor allem dem Schutz von zellulärer Autoreaktivität.

Für die Ausübung dieser T zellulären Funktionen treten die CD4 und CD8 Zelloberflächenproteine in Wechselwirkung mit den MHC-Molekülen auf den Zielzellen. CD4 und CD8 fungieren als sog. Ko-Rezeptoren, da sie den T Zellen

---

signalisieren, dass die Zielzellen ihr spezifisches Antigen gebunden haben. Der T Zellrezeptor (TZR) ist für die Kombination aus MHC-Molekül und gebundenem Antigen spezifisch, jeder TZR kann entweder an MHC-I oder MHC-II binden. Welches Molekül gebunden wird, richtet sich nach dem Ko-Rezeptor CD4 oder CD8 auf der T Zelloberfläche. In der Folge werden verschiedene Effektormoleküle, zum Beispiel Zytokine, freigesetzt, welche die Zielzelle entweder direkt beeinflussen oder andere Effektorzellen aktivieren. Man weiß heute, dass die hochgradig polymorphen MHC-Antigene auf dem Spenderorgan in der Transplantationsimmunologie im Rahmen der Organabstoßung durch den Empfängerorganismus die größte Rolle spielen.

#### **2.4.1.2.2 Signalmoleküle der T zellulären Immunität**

Als Zytokine bezeichnet man im Allgemeinen alle Proteine und Peptide, die von bestimmten Zellen sezerniert werden um auf andere Zellen in der Umgebung, die geeignete Rezeptoren besitzen, zu wirken und deren Aktivität zu steuern. Ihre Sekretion ist meist kurzzeitig und selbstlimitierend. Zu den funktionell bedeutsamsten von T Zellen produzierten Zytokinen gehören Interleukin-2 (IL-2), Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) und der Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ). Diese wurden im Rahmen dieser Arbeit, neben dem Oberflächenprotein CD69, als Marker der T zellulären Aktivierung und Reaktivität behandelt.

CD69 wird nach Aktivierung von T Zellen durch Bindung fremder Antigene an ihre TZR-Komplexe schnell und nur für einen kurzen Zeitraum auf den Zelloberflächen exprimiert. Es stellt somit einen Marker einer kürzlich stattgehabten Aktivierung dieses Zelltyps dar (GANTEN, 1999). Die T Zellaktivierung wird auch durch die gleichzeitig vermehrte Freisetzung des immunregulatorischen Zytokins IL-2 aus T Zellen, im Sinne einer autokrinen bzw. parakrinen Wirkung, angezeigt.

IL-2 bewirkt über Bindung an den T zellulären IL-2-Rezeptor den Übergang von der zellulären Wachstumsphase zur DNA-Synthesephase im Zellzyklus von CD4 und CD8 positiven T Zellen. IL-2 leitet somit die klonale T Zellexpansion nach erfolgter Zellaktivierung ein. Es ist gleichermaßen an der Induktion des Wachstums und der Differenzierung von B Zellen beteiligt und stimuliert T und NK Zellen zur Produktion des inflammationsregulatorisch wirkenden IFN $\gamma$ . IFN $\gamma$  wird hauptsächlich von CD4 T<sub>H0</sub> und T<sub>H1</sub> Zellen, zytotoxischen CD8 T Zellen und NK Zellen gebildet. Es wirkt im Allgemeinen verstärkend sowohl auf die zelluläre als auch humorale Immunantwort

durch Stimulation der MHC-I- und MHC-II-Expression auf zahlreichen Körperzellen und besitzt direkte antivirale/-bakterielle und auch antiproliferative Eigenschaften. IFN $\gamma$  führt zu einer verstärkten Produktion von CD4 T<sub>H</sub>1 Zellen, steigert gleichzeitig deren Fähigkeit zur Adhäsion an vaskuläre Endothelzellen und damit ihren Übertritt aus der Blutzirkulation an den Ort der Entzündung im peripheren Gewebe. Durch Makrophagenaktivierung unterstützt es die Elimination intrazellulärer Erreger. Zum anderen bewirkt es durch Anregung von neutrophilen Granulozyten zur Produktion von Radikalen und Verstärkung zytotoxisch wirkender NK Zellen, in Synergie mit dem proinflammatorischen Zytokin TNF $\alpha$  (siehe unten), die Lyse maligner Tumorzellen. Zur Beendigung der Inflammationsreaktion mit erfolgreicher Erregerelimination werden in Anwesenheit von IFN $\gamma$  vermehrt Komplementfaktor-

**Tabelle 1:** Auswahl der für diese Arbeit relevanten T zellulär exprimierten/sezernierten Aktivierungsmarker/Zytokine.

<b>Signalmolekül</b>	<b>Funktion (Beispiele)</b>
<b>CD69</b>	früh/kurzzeitig exprimierter T zellulärer Aktivierungsmarker
<b>IL-2</b>	immunregulatorisch
	T Zell-Aktivierung und klonale T Zell-Expansion
	Wachstum und Differenzierung B Zellen
	Induktion IFN $\gamma$ -Produktion durch T und NK Zellen
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	inflammationsregulatorisch
	Stimulation MHC-I- und MHC-II-Produktion
	antiviral/-bakteriell, antiproliferativ
	Aktivierung von Makrophagen, Neutrophilen, NK Zellen
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	proinflammatorisch
	Wirkung konzentrationsabhängig:
	<u>wenig TNF<math>\alpha</math></u>
	Stimulation MHC-I-Produktion
	Aktivierung Neutrophile
	Phagozyten: proinflammatorische Zytokine
	<u>viel TNF<math>\alpha</math></u>
	fieberinduzierend
	gerinnungshemmend
	<u>sehr viel TNF<math>\alpha</math></u>
	diffuse intravasale Gerinnung mit Verbrauchskoagulopathie
	Blutdrucksenkung, Gewebeminderperfusion, Hypoglykämie

---

bindende IgG-Antikörper gebildet, während die Produktion von IgE-Antikörpern und auch T<sub>H</sub>2-Zellen unterdrückt wird.

Die Reaktionsintensität der Komponenten des Immunsystems auf das hauptsächlich von phagozytierenden Zellen der unspezifischen Abwehr (Monozyten/Makrophagen), aber auch aktivierten T Zellen, NK Zellen und Mastzellen, sezernierte TNF $\alpha$  ist abhängig von der Menge vorhandener Zytokinmoleküle am Wirkort. In geringerer Menge stimuliert es die zelluläre MHC-I-Produktion und aktiviert neutrophile Granulozyten, somit hemmt es indirekt die intrazelluläre Virusreplikation. Gleichmaßen regt es Monozyten und Makrophagen zur Produktion proinflammatorischer Zytokine an und induziert eine vermehrte Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle. In größeren Mengen wirkt TNF $\alpha$  pyrogen durch die vermehrte Synthese von Prostaglandin- und Akutphase-Proteinen und hemmt sowohl die intrinsische als auch die extrinsische Gerinnungskaskade. Bei Anwesenheit sehr großer Mengen an TNF $\alpha$  tritt der gegenteilige Effekt ein: es wird eine diffuse intravasale Gerinnung mit konsekutiver Verbrauchskoagulopathie, Blutdruckabfällen und Gewebeminderperfusion sowie -nährstoffunterversorgung induziert (SIEGENTHALER, 2006) (siehe Tabelle 1).

Durch Chemokine, eine andere Proteinklasse mit Signalwirkung, werden Chemokinrezeptor-tragende Zellen, z.B. Granulozyten und Monozyten, aus dem Blutkreislauf in entzündetes Gewebe gelockt.

Zytokine werden, neben Chemokinen und anderen biologisch aktiven Signalmolekülen, auch von den Makrophagen gebildet, wodurch in infizierten Geweben eine Entzündungsreaktion ausgelöst wird. Die Entzündung kann auch durch das Komplementsystem verursacht sein, einer Gruppe von Plasmaproteinen, welche nach Kontakt mit bakteriellen Oberflächen durch proteolytische Reaktionen fragmentiert werden und sich in dieser Form auf Krankheitserregern, nicht aber auf Zellen des Wirtes, anlagern und diese dadurch für phagozytotische Zellen markieren.

#### **2.4.2 Das immunologische Gedächtnis**

Werden Antigenfragmente, gebunden an MHC-Moleküle, zusammen mit dem entsprechenden Ko-Stimulus erkannt, wird der den spezifischen Rezeptor tragende Lymphozyt zunächst proliferieren um eine ausreichende Menge identischer Tochterzellen zu erzeugen. Erst dann differenzieren sich diese zu den

---

entsprechenden Effektorzellen. Dieser Vorgang dauert bei Antigen-Erstkontakt etwa vier bis fünf Tage. Die meisten der so gebildeten Effektorlymphozyten sterben nach Ausübung ihrer Effektorfunktion ab. Eine gewisse Anzahl aktivierter B und T Lymphozyten bleibt jedoch bestehen, auch nachdem das Pathogen aus dem Wirtsorganismus eliminiert werden konnte; sie gehen also nicht durch Apoptose zugrunde. Diese Gedächtniszellen bilden die Grundlage für das in der Regel langanhaltende immunologische Gedächtnis, welches dafür sorgt, dass bei einem Zweitkontakt mit demselben Pathogen die ausgelöste Immunreaktion schneller und heftiger eintritt, indem sie sich wesentlich schneller zu Effektorzellen differenzieren können. Sie bilden die Grundlage der langanhaltenden Immunität nach erstmaligem Erregerkontakt bzw. nach einer Impfung (TESTI et al., 1989).

## **2.5 Ziel dieser Arbeit**

Die momentane Datenlage hinsichtlich dem Einsatz BKV-spezifischer T Zellen zur Identifikation von Risikopatienten unter Nierentransplantatempfängern ist divergent. Man findet zudem in der Allgemeinbevölkerung eine sehr hohe BKV-Seroprävalenz, so dass die Bestimmung des Serostatus ungeeignet scheint. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, inwieweit die quantitative und funktionelle Bestimmung der BKV-spezifischen T zellulären Immunität im Verlauf besser mit veränderten Virusreplikationsfrequenzen und auch -intensitäten korreliert als der quantitative BKV-Genomnachweis oder die qualitative Antikörperbestimmung.

Hierzu wurde eine detaillierte Charakterisierung der BKV-spezifischen humoralen und zellulären Immunantwort bei Immungesunden im Altersverlauf und bei Patienten nach Nierentransplantation durchgeführt. BKV-spezifische T Zellen wurden sowohl quantitativ als auch funktionell durch Zytokinprofiling und Proliferationsassay analysiert.

Folgende Fragen wurden im Einzelnen adressiert:

- Unterscheidet sich die BKV-spezifische Immunantwort quantitativ und funktionell in verschiedenen Altersgruppen immungesunder Probanden (Altersgruppen-Analyse)?
- Unterscheidet sich die BKV-spezifische Immunantwort bei immunsupprimierten Organtransplantierten Patienten mit BKV-assoziierten Komplikationen quantitativ und funktionell von der bei immunsupprimierten

---

Organtransplantierten beziehungsweise chronischen Hämodialyse-Patienten ohne Infekt komplikationen im Vergleich zu immungesunden Kontrollen (Risikogruppen-Analyse)?

---

### 3 Material und Methodik

#### 3.1 Geräte und Materialien

Geräte und Materialien	Firma, Firmensitz
96 Lochplatten	Greiner, Frickenhausen
Brutschrank (Hera cell 150)	Heraeus, Hanau
Durchflusszytometer (FACSCanto II)	BD Biosciences, Heidelberg
Kolbenhubpipetten (10, 20, 100, 200, 1000µl)	Abimed, Langenfeld
MACS Roller (MACSMix)	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Mikroskop CKX31	Olympus, Hamburg
Multipipette plus	Eppendorf, Hamburg
Neubauer Zählkammer	neoLab Migge Laborbedarf, Heidelberg
Pipettenspitzen für Kolbenhubpipetten	Sarstedt, Numbrecht
Pipettierhilfe (Pipetboy acu)	Integra Biosciences, Fernwald
Präzisions Dispenser Tips (5ml)	Eppendorf, Hamburg
Reagiergefäße (1,5ml)	Sarstedt, Numbrecht
Röhrchen für Durchflusszytometrie (5ml FACS Röhrchen)	Sarstedt, Numbrecht
Röhrchen Polypropylen (15ml Falcon)	Greiner, Frickenhausen
Röhrchen Polypropylen (50ml Falcon)	Greiner, Frickenhausen
Serologische Pipette (2, 5, 10, 25ml)	Sarstedt, Numbrecht
Sterile Werkbank (Hera Safe)	Heraeus, Hanau
Vortex Mixer 7-2020	neoLab Migge Laborbedarf, Heidelberg
Zentrifuge Megafuge 1.OR	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Labofuge	Heraeus, Hanau
Brefeldin A (Stock 5mg/ml in Ethanol)	Sigma, Deisenhofen

---

Geräte und Materialien	Firma, Firmensitz
BSA (Bovines Serumalbumin)	Serva, Heidelberg
CFDA-SE (Vybrant CFDA-SE Cell Tracer Kit), 10mM Stock in DMSO	Invitrogen, Karlsruhe
DMSO	AppliChem, Darmstadt
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Sigma, Steinheim
Essigsäure	Sigma, Steinheim
FACS Clean	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Flow	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Rinse	BD Biosciences, Heidelberg
FCS (fetales Kälberserum)	Biochrom, Berlin
FicoliteH (Ficoll)	Linaris, Dossenheim
HSA (humanes Serumalbumin)	CSL Behring, Marburg
Lysing-Lösung (10x konzentriert, 1x Verdünnung mit H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> )	BD Biosciences, Heidelberg
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> ) (10% in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> )	Serva, Heidelberg
Paraformaldehyd (1% in PBS)	AppliChem, Darmstadt
PBS (phosphatgepufferte Salzlösung)	PAA, Colbe
Penicillin-Streptomycin (P/S)	PAA, Colbe
RPMI-Medium 1640 + 1% L-Glutamin (Gln)	Sigma, Steinheim
Saponin	Sigma, Steinheim

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Antikörper zur Anwendung bei der Stimulation oder durchflusszytometrischen Färbung sind in Tabelle 2 aufgeführt.

**Tabelle 2:** Eingesetzte Antikörper mit Angaben zur Herkunft (Klon, Ig-Klasse), Konzentration und Fluorochrom-Kopplung.

Antikörper	Klon	Ig-Klasse	Konzentration	Firma, Firmensitz
anti-CD28	L293	IgG1 κ	0,5 mg/ml	BD Biosciences, Heidelberg
anti-CD49d	9F10	IgG1 κ	1,0 mg/ml	BD Biosciences, Heidelberg
anti-CD3 APC	SK1	IgG1 κ	0,05 mg/ml	BD Biosciences, Heidelberg
anti-CD4 PE	SK3	IgG1	0,003 mg/ml	BD Biosciences, Heidelberg
anti-CD4 PE-Cy7	SK3	IgG1 κ	0,012 mg/ml	BD Biosciences, Heidelberg
anti-CD8 PerCP	SK1	IgG1	0,0125 mg/ml	BD Biosciences, Heidelberg
anti-CD69 PerCP	L78	IgG1	0,05 mg/ml	BD Biosciences, Heidelberg
anti-IL-2 PE	MQ1-17H12	IgG2a	nicht bekannt	BD Biosciences, Heidelberg
anti-IFN $\gamma$ FITC	4S.B3	IgG1 κ	0,5 mg/ml	BD Biosciences, Heidelberg
anti-TNF $\alpha$ APC	MAb 11	IgG1	0,2 mg/ml	BD Biosciences, Heidelberg

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Puffer und Medien sind in Tabelle 3 aufgeführt.

**Tabelle 3:** Puffer und Medien.

Puffer/Medium	Zusammensetzung
FACS-Puffer	PBS, 5% FCS, 0,5% BSA, 0,07% NaN <sub>3</sub> )
Saponin-Puffer	FACS-Puffer, 0,1% Saponin
Markiermedium	RPMI 1% Gln, 1% P/S, 0,5% HSA
Wachstumsmedium	RPMI 1% Gln, 1% P/S, 5% FCS

### 3.2 Messmethode Durchflusszytometrie

Mithilfe der Durchflusszytometrie, welche auch unter dem Begriff FACS ("fluorescence activated cell sorting")-Analyse bekannt ist, können einzelne Zellen, wie zum Beispiel Subpopulationen von Lymphozyten oder Monozyten, in Blutproben

---

durch Ausnutzung ihrer physikalischen sowie Fluoreszenzeigenschaften funktionell voneinander getrennt und gezählt werden.

Während des Messvorgangs werden die Zellen nach Aufnahme in ein größeres Flüssigkeitsvolumen durch hydrodynamische Fokussierung, das heißt Verwandlung in einen feinen Flüssigkeitsstrahl mithilfe einer Düse, an einer Messkapillare durch einen Hüllstrom vereinzelt und beschleunigt, sodass am Messpunkt nur einzelne Zellen den Laserstrahl passieren. Jede dieser Zellen emittiert dabei Vorwärtsstreulicht („Forward Scatter“ (FSC)), welches mit der Zellgröße korreliert, sowie Seitwärtsstreulicht („Side Scatter“ (SSC)), das als Maß für die Zellgranularität dient.

Meist werden zusätzlich Fluorochrom-gekoppelte monoklonale Antikörper eingesetzt, die spezifisch an bestimmte Zelloberflächenmoleküle, wie zum Beispiel CD4 oder CD8 auf T Lymphozyten, binden. Durch diese können auch, nach vorangegangener chemischer Permeabilisierung der Zellmembran, intrazelluläre Moleküle markiert werden.

Monochromatisches Licht einer bestimmten Wellenlänge (Anregungslicht) hebt die Elektronen des extra- oder intrazellulär gebundenen Antikörper-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffs auf ein höheres Energieniveau. Aus diesem instabilen Zustand des höheren Energieniveaus fallen die Elektronen nach kurzer Zeit wieder zurück auf das stabile Ausgangsenergielevel und geben dabei eine bestimmte Energiemenge in Form von Photonen ab (Emissionslicht). Diese Energie wird mittels Photodetektoren eines optischen Systems gemessen.

Da die verschiedenen eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe trotz gleicher Anregungswellenlänge unterschiedliche, für jeden einzelnen Farbstoff charakteristische, Emissionswellenlängen besitzen, können bei Einsatz eines einzelnen Lasers unterschiedliche Farbstoff-gekoppelte Antikörper gleichzeitig verwendet werden. Dadurch wird die parallele Untersuchung verschiedener Zelleigenschaften aus einem Probenansatz ermöglicht.

Bei Verwendung von zwei oder mehr monoklonalen Antikörpern stellt die Verarbeitungssoftware des Geräts die Daten als zweidimensionales Streuungs- oder als Konturdiagramm dar. Darin wird auf den einzelnen Achsen die Fluoreszenz eines Antikörpers gegen die eines zweiten aufgetragen, wodurch eine ein bestimmtes Oberflächenantigen tragende Zellpopulation weiter subspezifiziert werden kann.

Bei sehr großen Gesamtzellzahlen lassen sich mittels der FACS-Analyse Subquantifizierungen anhand spezifischer Oberflächenmoleküle durchführen, wie zum Beispiel die Sortierung von Lymphozyten anhand des T Zellrezeptor-assoziierten CD3 Antigens und dann weitere Unterteilung der T Zellen in CD4 und CD8 positive Zellen.

Die Verwendung mehrerer Laser mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen erlaubt zudem die gleichzeitige Analyse mehrerer Parameter in einer Probe, weswegen oftmals mehr als ein Laser eingesetzt wird. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Fluorochrome Carboxy-Fluorescein-Succinimidyl-Ester/CFSE, Fluoresceinisothiocyanat/FITC, Phycoerythrin/PE, Peridinin Chlorophyll Proteinkomplex/PerCP und Phycoerythrin Cyanin 7/PE-Cy7 wurden nach Anregung durch einen im Durchflusszytometer eingebauten blauen Laser mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm gemessen, das Fluorochrom Allophycocyanin/APC nach Anregung durch einen roten Laser mit einer Anregungswellenlänge von 633 nm (siehe Tabelle 4).

**Tabelle 4:** Zur durchflusszytometrischen Analyse verwendete Fluoreszenzfarbstoffe.  
(Emissions-WL=Emissionswellenlänge, Anregungs-WL=Anregungswellenlänge)

Fluorochrom	kurz	Emissions-WL	Anregungs-WL	Laser
Carboxy-Fluorescein-Succinimidyl-Ester	CFSE	517 nm	488 nm	blau
Fluoresceinisothiocyanat	FITC	519 nm	488 nm	blau
Phycoerythrin	PE	578 nm	488 nm	blau
Peridinin Chlorophyll Proteinkomplex	PerCP	678 nm	488 nm	blau
Phycoerythrin Cyanin 7	PE-Cy7	785 nm	488 nm	blau
Allophycocyanin	APC	680 nm	633 nm	rot

### 3.3 Quantifizierung Antigen-spezifischer T Zellen aus Vollblut

Mithilfe einer Antigen-spezifischen Stimulation aus Vollblut können die für einen bestimmten Stimulus spezifischen Zellen qualitativ sowie quantitativ charakterisiert werden. Bei diesem Kurzzeitstimulations-Assay werden die interessierenden Zellen, zum Beispiel T Lymphozyten, direkt aus dem Vollblut des Probanden mit dem entsprechenden antigenen Stimulus sowie ko-stimulatorisch wirksamen Antikörpern

---

inkubiert. Je Proband werden drei Probenansätze angelegt: das interessierende Antigen als Stimulus, ein Kontrollantigen als Positivkontrolle und eine Lösungsmittel-Negativkontrolle.

Um die als Reaktion auf den Stimulus spezifisch produzierten und sezernierten Zytokine intrazellulär anzureichern und dadurch zellgebunden messen zu können, wird allen Probenansätzen nach zwei Stunden Inkubationszeit das Lacton-Antibiotikum Brefeldin A (BFA) hinzugegeben. Diese Substanz blockiert intrazellulär den retrograden Transport von Proteinen und Proteinbestandteilen aus dem Golgi-Apparat in das Endoplasmatische Retikulum (ER), was zu einer Akkumulation sekretorischer Peptide/Proteine im ER führt. Damit wird erreicht, dass die interessierenden Zytokine für die durchflusszytometrischen Analysen nicht sezerniert werden und sich somit in der Zelle anreichern.

Nach insgesamt sechs Stunden Inkubation und Fixierung der Zellen sowie anschließender Zellmembranpermeabilisierung können die spezifisch produzierten, intrazellulär gehaltenen Zytokine und andere Zelltyp-charakterisierende Marker durch den Einsatz von Fluorochrom-gekoppelten monoklonalen Antikörpern detektiert werden. Antigen-spezifische T Zellen werden im Rahmen dieser Messmethode üblicherweise durch Verwendung einer Kombination aus einem Aktivierungsmarker (zum Beispiel CD69), aus bestimmten Oberflächenmolekülen (zum Beispiel CD3 und CD4 oder CD8) und durch Zytokine (zum Beispiel IFN $\gamma$ , IL-2) charakterisiert.

### **3.3.1 Die verwendeten Antigene**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Induktion einer Antigen-spezifischen Aktivierung und Zytokinproduktion BKV-Large T-Antigen sowie ein VP1-Peptidmix verwendet. Als Negativkontrolle diente das Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) und als Positivkontrolle das zu den Superantigenen gehörende *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB) (siehe Tabelle 5). SEB ist in der Lage, gleichzeitig an die V $\beta$ -Region des T Zellrezeptors auf T Lymphozyten und an MHC-II-Moleküle auf APZ zu binden und dadurch zahlreiche T Zellen Antigen-unabhängig direkt zu aktivieren. Das heißt, SEB muss nicht erst den T Zellen nach vorheriger Fragmentierung in einzelne Peptide auf APZ an MHC-II-Moleküle gebunden, präsentiert werden um eine massive Zytokinproduktion hervorzurufen. Dieser Mechanismus hat den Vorteil, dass durch den Einsatz von SEB als Positivkontrolle festgestellt werden kann, ob ein

---

Proband generell in der Lage ist, auf einen eingesetzten Stimulus mit einer adäquaten Immunantwort zu reagieren.

**Tabelle 5:** Zur spezifischen Stimulation eingesetzte Antigene.

Antigene	Stocklösung	Firma, Firmensitz
überlappende Peptide von BKV-VP1/Large T-Antigen	0,625 µg/µl in DMSO	JPT Peptide Technologies, Berlin
Staphylococcus aureus Enterotoxin B (SEB)	1 mg/ml in H <sub>2</sub> O	Sigma, Steinheim

### 3.3.2 Die Durchführung

#### 3.3.2.1 Vollblut-Stimulation

Zunächst wurden 1 µg/ml Vollblut anti-CD28-Antikörper sowie 1 µg/ml Vollblut anti-CD49d-Antikörper vorgelegt (siehe Tabelle 2). Danach wurde das benötigte Vollblutvolumen für drei Probenansätze pro Proband hinzupipettiert und gründlich durchmischt. Anschließend wurden je 450 µl Vollblut bei erwachsenen Probanden und je 300 µl bei Kindern (bei diesen wurden die Antigenmengen auf das kleinere Volumen angepasst) auf die einzelnen Röhren verteilt.

Die Stimulation erfolgte mit überlappenden Peptiden von BKV-VP1 und Large T-Antigen in der Konzentration 4,11 µg Peptidmischung/ml Vollblut (Peptidmischung in Lösungsmittel DMSO). Als Positivkontrolle diente 2,5 µg/ml Vollblut *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB) (siehe Tabelle 5).

Nach Durchmischung der Proben wurden diese 2 Stunden aufrecht im Brutschrank bei 37°C und 6% CO<sub>2</sub>-Gehalt mit lose aufgeschraubten Deckeln inkubiert. Es folgte die Zugabe von 10 µg/ml Vollblut Brefeldin A (BFA) und danach eine Inkubation für weitere 4 Stunden.

#### 3.3.2.2 Fixierung der Zellen

Nach Ablauf der insgesamt 6-stündigen Inkubationszeit im Brutschrank wurden jeweils 100 µl/ml Vollblut 20 mM EDTA in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> hinzupipettiert und die Röhren jeweils für 10 Sekunden auf dem Vortex-Mixer (Vortex) gründlich durchmischt. Es folgte eine weitere Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur (RT) und im

---

Anschluss an diese wurden den Proben jeweils 9 ml/ml Vollblut Lysing-Lösung hinzugefügt und danach kurz auf dem Vortex gemischt. Nach erneuter 10-minütiger Inkubation bei RT wurden die Proben für 10 Minuten bei 353 x g (1300 Umdrehungen/Minute (U/min)) zentrifugiert und anschließend der Überstand vorsichtig abgesaugt. Die in den Röhrchen verbleibenden Zellpellets wurden nun mit jeweils 2 ml FACS-Puffer gewaschen. Nach der zweiten Zentrifugation für 10 Minuten bei 353 x g und anschließendem Absaugen des Überstands erfolgte die Aufnahme in 400 µl FACS-Puffer je Röhrchen und Lagerung im Kühlschrank bei 4°C bis zur weiteren Verwendung innerhalb von maximal 72 Stunden.

### **3.3.2.3 FACS-Färbung**

Für jede einzelne Färbung wurden 200 µl Zellsuspension auf FACS-Röhrchen verteilt und jeweils 2 ml Saponin-Puffer hinzupipettiert. Nach 10-minütiger Inkubationszeit bei RT wurden die FACS-Röhrchen für 10 Minuten bei 353 x g zentrifugiert und anschließend der Überstand abgesaugt. Nun erfolgte die Zugabe von 50 µl Antikörper-Mischung (siehe Tabelle 6) je Probe. Nach erneutem kurzen Durchmischen auf dem Vortex wurden die Proben für 30 bis 45 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 3 ml FACS-Puffer je Röhrchen, Zentrifugation für 10 Minuten bei 353 x g sowie wiederum Absaugen des Überstands. Nun wurden zu den verbliebenen Zellpellets jeweils 300 µl PBS/1% Paraformaldehyd (PFA) hinzugefügt, kurz auf dem Vortex durchmischt und die FACS-Röhrchen schließlich sofort gemessen oder im Kühlschrank bei 4°C bis zur durchflusszytometrischen Messung innerhalb von maximal 24 Stunden aufbewahrt.

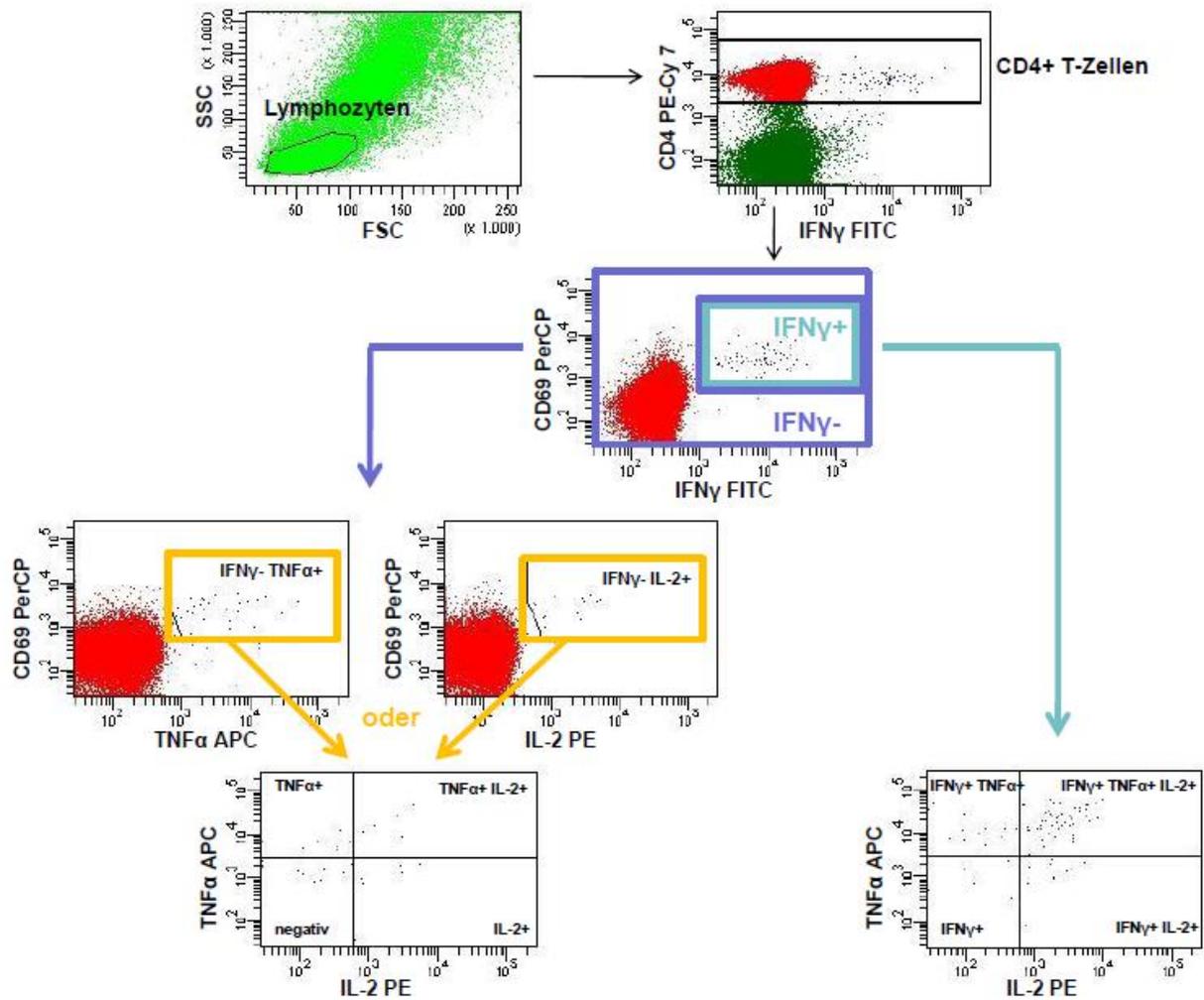
**Tabelle 6:** Zusammensetzung der Antikörpermischung für die FACS-Färbung im Kurzzeitstimulations-Assay.

<b>Antikörper</b>	<b>Fluoreszenzmarker</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Menge in <math>\mu</math>l</b>
anti-CD4	PE-Cy7	0,012 mg/ml	0,5
anti-CD69	PerCP	0,05 mg/ml	2
anti-IL-2	PE	nicht bekannt	2
anti-IFN $\gamma$	FITC	0,5 mg/ml	0,5
anti-TNF $\alpha$	APC	0,2 mg/ml	0,15
Saponin 5%			1
FACS-Puffer			43,85
<b>gesamt</b>			<b>50</b>

#### ***3.3.2.4 Durchflusszytometrische Messung und deren Auswertung nach der Kurzzeitstimulation***

Alle Messungen und deren Auswertung erfolgten am FACS Canto II-Durchflusszytometer unter Verwendung der FACS Diva Software Version 6.1.3.

Bei den BKV-spezifischen Stimulationen aus Vollblutproben wurden pro Ansatz mindestens 10000 CD4 T Zellen durchflusszytometrisch erfasst und anschließend unterschiedliche Zellen-einschließende Messregionen (sogenannte Gates) zur Auswertung angelegt (siehe Abbildung 1).



**Abbildung 1: Gating-Strategie zur durchflusszytometrischen Analyse der intrazellulären IFN $\gamma$ , IL-2 und TNF $\alpha$ -Färbung.** Ausgehend von der Gesamtlymphozytenpopulation im Probanden-Vollblut werden aktivierte CD4 T Zellen anhand der Eigenschaft IFN $\gamma$  zu produzieren in IFN $\gamma$ -positive und IFN $\gamma$ -negative CD4 T Zellen getrennt. Diese beiden Zellsubpopulationen können dann getrennt voneinander bezüglich ihres IL-2- und TNF $\alpha$ -Signals untersucht werden. (FSC=Vorwärtsscatter; SSC=Seitwärtsscatter).

---

### **3.4 Proliferations-Assay**

Alle Schritte dieser Untersuchung bis zur Ernte und Färbung der Zellen erfolgten unter sterilen Bedingungen.

Im Rahmen der Langzeitstimulation wurden isolierte PBMCs in einem Wachstumsmedium (siehe Tabelle 3) in 96-Lochplatten über 7 Tage kultiviert.

Die Beobachtung des Vitalitätserhalts mit kontinuierlicher Zellteilung erfolgte in regelmäßigen Abständen unter mikroskopischer Kontrolle. Bei sehr starker, Lochvolumen-bedingter, wachstumsbehindernder Proliferation wurden die Zellen daraufhin im Verhältnis 1:2 gesplittet, indem die Zellen zunächst durch Auf- und Abpipettieren des Wachstumsmediums vom Gefäßboden gelöst und im Anschluss zu gleichen Teilen auf zwei Löcher in der Lochplatte verteilt wurden. Die ursprüngliche Volumenmenge pro Loch wurde durch Zugabe frischen Wachstumsmediums sichergestellt. Alle SEB-Ansätze wurden an Tag 3 in oben beschriebener Weise im Verhältnis 1:2 gesplittet.

#### **3.4.1 Isolierung von PBMCs über Ficoll-Gradienten**

Mithilfe eines Gradienten, welcher durch die Verwendung von synthetisch hergestellten Polysacchariden (Ficoll) während eines Zentrifugationsschrittes erzeugt wird, können PBMCs aus Vollblutproben isoliert werden.

Bei der Zentrifugation bildet sich zwischen Serum im oberen Teil des Röhrchens und roten Blutbestandteilen und toten Zellen mit höherer Dichte im unteren Teil eine weiße Intermediärschicht aus mononukleären Zellen. Diese Schicht muss separat durch vorsichtiges Absaugen in ein neues Gefäß überführt werden, Serum- und/oder Erythrozytenbestandteile sollen zurückbleiben.

Zu Beginn wurden 7-12 ml heparinisiertes Vollblut unter sterilen Bedingungen in ein 50 ml fassendes Falcon-Röhrchen überführt und mit PBS/0,02% EDTA (PBS-EDTA) auf ein Gesamtvolumen von 35 ml aufgefüllt. Nach kurzem manuellen Durchmischen wurde die Lösung mit 13 ml Ficoll langsam unterschichtet und nachfolgend bei 1303 x g (2500 U/min) ohne Bremse zentrifugiert. Die entstandene Intermediärschicht wurde mithilfe einer 5 ml-Pipette vorsichtig abgehoben und in ein neues steriles Falcon-Röhrchen gegeben. Es wurde erneut mit PBS-EDTA auf ein Gesamtvolumen von 50 ml aufgefüllt und gut gemischt. Nach Zentrifugation für 10 Minuten bei 676 x g (1800 U/min) wurde der flüssige Überstand abgesaugt und

---

verworfen und das Zellpellet vom Röhrchenboden gelöst. Nach einem Waschschrift mit PBS-EDTA wurde erneut für 10 Minuten bei 300 x g (1200 U/min) zentrifugiert. Nachdem der Überstand erneut abgesaugt und verworfen wurde, wurde das vom Röhrchenboden gelöste Zellpellet in 1 ml PBS/0,1% HSA aufgenommen und diese Lösung in ein neues steriles 15 ml fassendes Falcon-Röhrchen überführt.

### **3.4.2 Markierung der PBMCs mit CFSE**

Bei Carboxy-Fluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester (CFDA-SE) handelt es sich um einen membrangängigen, nicht zytotoxischen Fluoreszenzfarbstoff. Nach Eintritt in die Zelle wird von diesem durch intrazelluläre Esterasen die Diacetat-Gruppe abgespalten, woraufhin das entstandene Carboxy-Fluorescein-Succinimidyl-Ester (CFSE) zum Ladungsausgleich kovalent an freie Aminogruppen zytoplasmatischer Proteine bindet und damit in der Zelle fixiert ist. Mit jeder mitotischen Zellteilung wird der Farbstoff, dessen Gesamtmenge konstant bleibt, zu gleichen Teilen an die entstehenden Tochterzellen weitergegeben, sodass sich die Fluoreszenzintensität pro Zelle dabei jeweils auf die Hälfte reduziert. Somit nimmt die Fluoreszenzintensität innerhalb der entstehenden Zellpopulation gleichen Ursprungs logarithmisch ab. Dieser Abfall ermöglicht es, zur Beurteilung von Proliferationsaktivitäten die Zellzahl in den einzelnen Teilungsstadien durchflusszytometrisch bei einer Emissionswellenlänge von 517 nm zu erfassen.

#### **3.4.2.1 Durchführung der Markierungsreaktion**

Im ersten Schritt wurde 1 ml Zellsuspension ( $1-50 \times 10^6$  PBMC) mit dem gleichen Volumen 2 x Labeling-Lösung (PBS, 0,1% HSA, 10  $\mu$ M CFSE) vermischt und danach für 10 Minuten liegend bei 37°C auf einem MACS Roller im Dunkeln gedreht.

Diese Markierungsreaktion wurde durch Zugabe von 13 ml Markiermedium (siehe Tabelle 3) beendet. Im Anschluss wurden die Zellen für 10 Minuten bei 353 x g zentrifugiert und der Überstand danach abgesaugt. Das am Röhrchenboden verbliebene Zellpellet wurde gelöst und in 15 ml Markiermedium aufgenommen. Die Suspension wurde erneut für 5 Minuten liegend auf dem MACS Roller im Dunkeln gedreht und anschließend für 10 Minuten bei 353 x g zentrifugiert. Es wurde der Überstand abgesaugt und verworfen, das Zellpellet vom Röhrchenboden gelöst und wieder in 15 ml Markiermedium resuspendiert. Das Ganze wurde letztmalig auf dem MACS Roller im Dunkeln bei 37°C für 5 Minuten gedreht und 10 Minuten bei 353 x g

---

zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand wieder abgesaugt und das vom Röhrchenboden gelöste Zellpellet in 4 ml Wachstumsmedium aufgenommen.

Von der so hergestellten Zellsuspension wurden 5 µl im Verhältnis 1:10 mit 3%-iger Essigsäure verdünnt und die Zellzahl anschließend mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer und durch Verwendung der folgenden Formeln bestimmt:

$$\text{Zellen/ml} = \text{Mittelwert (Zellen)} \times \text{Kammerfaktor (10}^4\text{)} \times \text{Verdünnungsfaktor (hier 10)}$$

$$\text{Zellen}_{\text{gesamt}} = \text{Zellen/ml} \times \text{vorgelegtes Volumen (hier 4 ml)}.$$

Es wurden dafür die Zellen in 16 Kleinquadraten (4 x 4 Großquadrate) der Neubauer-Kammer ausgezählt.

### **3.4.3 Stimulation CFSE-markierter Proben**

Die im vorangegangenen Schritt hergestellte Zellsuspension wurde zuerst für 10 Minuten bei 353 x g zentrifugiert und das vom Röhrchenboden gelöste Zellpellet in ein entsprechendes Volumen Wachstumsmedium aufgenommen, sodass in dieser Lösung 600000 PBMCs/30 µl Wachstumsmedium vorlagen.

Nun wurden pro Ansatz 30 µl dieser Zellsuspension in ein Loch einer 96-Lochplatte gegeben und jeweils mit 30 µl eines Stimulantien-enthaltenden Wachstumsmediums vermischt. Es ergibt sich daraus pro Loch ein Gesamtvolumen von 60 µl, welches die Stimulantien in den Konzentrationen 4,11 µg/ml Vollblut BKV-Antigen beziehungsweise 2,5 µl/ml Vollblut SEB (Positivkontrolle) beinhaltet. Als Negativkontrolle diente – wie im Kurzzeitstimulations-Assay – das Lösungsmittel DMSO in entsprechender Konzentration (0,66%/ml).

Die befüllte 96-Lochplatte wurde daraufhin über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Am darauffolgenden Tag (Tag 1) wurden 240 µl Wachstumsmedium zu jedem Ansatz hinzupipettiert (Gesamtvolumen jeweils 300 µl). An Tag 3 wurden die mit SEB stimulierten Probenansätze wegen der bei diesem Stimulanz zu erwartenden starken Proliferation 1:2 gesplittet.

### **3.4.4 Ernte und Färbung CFSE-markierter stimulierter Proben**

An Tag 7 der Untersuchung wurden zunächst vorsichtig 150 µl Medium abgenommen (Überstand) und bei -80°C für eventuelle spätere Analysen von im Rahmen der Proliferation freigesetzten Zytokinen eingefroren.

Die sich in den verbleibenden 150 µl Wachstumsmedium befindenden Zellen wurden resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Anschließend wurden eventuell zurückgebliebene Zellen durch zweimaliges Spülen mit je 200 µl PBS ebenfalls in die FACS-Röhrchen übertragen. Nach Zugabe von jeweils 100 µl/ml 20 mM EDTA in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> in jedes FACS-Röhrchen wurden die Ansätze für 10 Sekunden auf dem Vortex gut durchmischt.

Nach Inkubation der Ansätze für 15 Minuten bei RT im Dunkeln wurden je Röhrchen 2 ml FACS-Puffer hinzugefügt und diese dann für 10 Minuten bei 353 x g zentrifugiert. Im darauffolgenden Schritt wurden die Zellen nach Absaugen des Überstandes in jeweils 50 µl Antikörpermischung aufgenommen (siehe Tabelle 7) und für 30 bis 45 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach erfolgte die erneute Zugabe von 3 ml FACS-Puffer je Ansatz und Zentrifugation für 10 Minuten bei 353 x g. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen für die folgende durchflusszytometrische Analyse in jeweils 300 µl PBS/1% PFA aufgenommen.

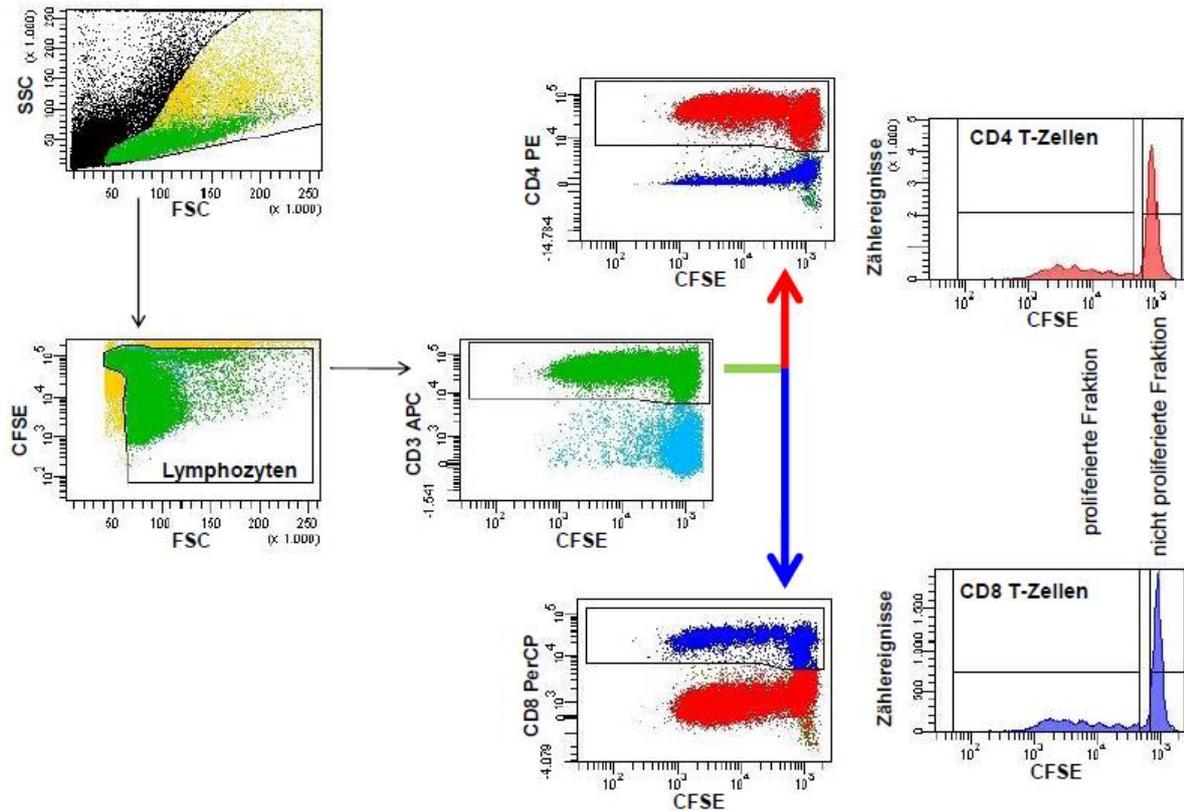
### 3.4.5 Durchflusszytometrische Messung und deren Auswertung nach der Zellkultur

Alle Messungen und deren Auswertung erfolgten am FACS Canto II-Durchflusszytometer unter Verwendung der FACS Diva Software Version 6.1.3.

Bei den Proliferations-Assays wurden pro Ansatz 10000-100000 CD3 positive Zellen durchflusszytometrisch erfasst und eine Gating-Strategie zur Auswertung festgelegt (siehe Abbildung 2).

**Tabelle 7:** Zusammensetzung der Antikörpermischung für die FACS-Färbung im Proliferations-Assay.

Antikörper	Fluoreszenzmarker	Menge in µl
anti-CD4	PE	4
anti-CD8	PerCP	6
anti-CD3	APC	1
FACS-Puffer		39
<b>gesamt</b>		<b>50</b>



**Abbildung 1: Gating-Strategie zur durchflusszytometrischen Analyse der Proliferation von Lymphozytensubpopulationen.** Innerhalb der Gesamtlymphozytenpopulation im Probanden-Vollblut werden CD3 positive T Zellen eingegrenzt und diese Subpopulation anhand der vorhandenen Oberflächenmarker CD4 und CD8 aufgetrennt. Die Proliferation dieser T Zellsubpopulationen wird mit Hilfe des CFSE (Carboxy-Fluorescein-Succinimidyl-Ester)-Signals in separaten Histogrammen graphisch dargestellt. (FSC=Vorwärtsscatter; SSC=Seitwärtsscatter)

### 3.5 Bestimmung des BKV-spezifischen Serostatus

Der Nachweis BKV-spezifischer Antikörper (IgM und IgG) erfolgte in 1:400 verdünntem Probandenplasma. Im verwendeten ELISA dienen 50 ng gebundene BKV-ähnliche Partikel (BKV-like particles, VLP) als Antigene. Diese wurden aus gereinigten VP1-produzierenden Baculovirus-infizierten SF9 Zellen nach Lyse und Gradientenzentrifugation gewonnen. Eine positive BKV-spezifische Antikörperreaktion war dabei definiert als Überschreiten des Grenzwerts von 0,110 bei einer optischen Dichte (OD) 492 nm nach Abzug von nicht-VLP-exprimierenden Lysaten (Negativkontrolle) (GINEVRI et al., 2007).

Die im Rahmen dieser Arbeit rekrutierten Serumproben wurden durch die Arbeitsgruppe um Prof. H. Hirsch (Institut für Transplantationsvirologie der Universität Basel) analysiert.

---

### 3.6 Patienten und Probandenkollektiv

Alle Vollblutproben wurden in Zusammenarbeit mit den kooperierenden Abteilungen der Universitätskliniken des Saarlandes Homburg/Saar (Klinik für Innere Medizin IV - Nieren- und Hochdruckkrankheiten; Kliniken für Kinder- und Jugendmedizin) nach Aufklärung mit Einverständnis des jeweiligen Probanden beziehungsweise der erziehungsberechtigten Personen für dieses Projekt gesammelt. Die Studie wurde nach Genehmigung durch die saarländische Ethikkommission durchgeführt.

Es wurde ein Gesamtkollektiv von 185 Probanden untersucht (siehe Tabelle 8). Dieses setzte sich zusammen aus 122 gesunden Kontrollen (Alter  $27,60 \pm 21,21$  Jahre, 1-84 Jahre) sowie 38 Nierentransplantatempfängern (RTx; Alter  $55,20 \pm 14,89$  Jahre, 28-74 Jahre), von denen bei 14 Probanden (RTx-BKVpos; Alter  $61,79 \pm 10,78$  Jahre) zurückliegend eine BKV-Reaktivierung nachgewiesen werden konnte (Nachweiskriterien siehe Abschnitt 3.7). Bei den übrigen 24 Organempfängern war zum Zeitpunkt der Untersuchung in der Vergangenheit weder eine klinisch manifeste BK-Virurie noch -Virämie aufgetreten (RTx-BKVneg; Alter  $51,36 \pm 15,78$  Jahre), sie erfüllten keines der unter Abschnitt 3.7 zusammengefassten Kriterien.

Alters-angepasst zu den 38 Nierentransplantatempfängern wurde aus der Gesamtheit der 122 immungesunden Kontrollen ein Kollektiv aus 23 Kontrollpersonen (Kontrollen; Alter  $56,32 \pm 16,04$  Jahre) zusammengestellt sowie 25 Hämodialysepatienten (HD; Alter  $61,34 \pm 17,95$  Jahre, 24-83 Jahre) als Vor-Transplantationskontrollen eingeschlossen (siehe Tabelle 9).

**Tabelle 8:** Das untersuchte Gesamtkollektiv (n = 185) mit Eigenschaften der Subgruppen.

Subgruppe	Eigenschaften	Alter	mittleres Alter
122 Kontrollen	gesunde Individuen	1-84 Jahre	$27,60 \pm 21,21$ Jahre
38 RTx	Nierentransplantatempfänger	28-74 Jahre	$55,20 \pm 14,89$ Jahre
24 RTx-BKVneg	ohne nachgewiesene BK Virämie		$51,36 \pm 15,78$ Jahre
14 RTx-BKVpos	mit nachgewiesener BK Virämie		$61,79 \pm 10,78$ Jahre
25 HD	Hämodialysepatienten	24-83 Jahre	$61,34 \pm 17,95$ Jahre

(RTx = Nierentransplantatempfänger, RTx-BKVneg/pos = Nierentransplantatempfänger ohne/mit klinisch manifeste(r) BKV-Reaktivierung, HD = Hämodialysepatienten).

**Tabelle 9:** Eigenschaften der Alters-angepassten Probandenkollektive.

Kollektiv	Kontrollen	HD	RTx-BKVneg	RTx-BKVpos
Anzahl	23	25	24	14
Alter (Jahren)	56,32 ± 16,04	61,34 ± 17,95	51,36 ± 15,78	61,79 ± 10,78
Zeitraum seit Tx (Monate)	n.b.	n.b.	24,78 ± 27,06	18,20 ± 19,79
Zeitraum seit klinisch manifester BKV-Reaktivierung (Monate)	n.b.	n.b.	n.b.	14,17 ± 17,26

(Tx = Transplantation, HD = Hämodialysepatienten, RTx-BKVneg/pos = Nierentransplantatempfänger ohne/mit klinisch manifeste(r) BKV-Reaktivierung, n.b. = nicht bestimmbar).

Die Proliferationsaktivität BKV-spezifischer T Zellen wurde anhand der Vollblutproben von 29 immungesunden Kontrollpersonen (Alter 36,47 ± 24,04 Jahre), 11 RTx-BKVpos-Patienten (Alter 61,36 ± 11,75 Jahre), 11 RTx-BKVneg-Patienten (Alter 57,44 ± 14,57 Jahre) sowie 10 HD-Patienten (Alter 66,03 ± 15,04 Jahre) untersucht.

Die Analyse BKV-spezifischer IgG- und IgM-Antikörper erfolgte in Serumproben von 154 Probanden (116 gesunde Kontrollen, 22 Hämodialysepatienten und 16 Nierentransplantatempfänger (11 RTx-BKVneg, 5 RTx-BKVpos).

### **3.7 Nachweiskriterien einer manifesten BKV-Reaktivierung**

Kriterien für das Vorliegen einer klinisch manifesten BKV-Reaktivierung wurden wie folgt definiert: 1. durch den Nachweis von mehr als  $10^4$  BKV-DNA-Kopien/ml Plasma oder mehr als  $10^7$  BKV-DNA-Kopien/ml Urin in mindestens zwei aufeinanderfolgend untersuchten Proben oder 2. durch den Nachweis von mehr als  $10^4$  BKV-DNA-Kopien/ml Plasma oder mehr als  $10^7$  BKV-DNA-Kopien/ml Urin in einer untersuchten Probe in Kombination mit einem nicht auf andere Ursachen zurückführbaren zeitnahen Anstieg des Serumkreatinins oder 3. durch den Nachweis von mehr als  $10^3$  BKV-DNA-Kopien/ml Plasma und mehr als  $10^6$  BKV-DNA-Kopien/ml Urin in Kombination mit einem zeitnahen Serumkreatinin-Anstieg, welcher sich unter reduzierter bzw. umgestellter immunsuppressiver Therapie rückläufig präsentiert oder 4. durch das Vorliegen einer Biopsie-gesicherten BKV-assoziierten Nephropathie (BKVN).

---

### 3.8 Statistische Analysen

Alle statistischen Berechnungen wurden mithilfe von GraphPad Prism® durchgeführt. Zur Analyse gepaarter, nicht-parametrischer Daten wurde der Friedman-Test (ANOVA) eingesetzt, für ungepaarte, nicht-parametrische Daten der Kruskal-Wallis-Test (ANOVA). Die Korrelationsanalysen erfolgten mit dem Spearman-Test. Bei sämtlichen durchgeführten Auswertungen wurde ein Signifikanzwert von  $p < 0,05$  als Bestätigung der statistischen Signifikanz der Testergebnisse angenommen.

### 3.9 Software

Die in Tabelle aufgeführte Software kam im Rahmen dieser Arbeit zum Einsatz.

**Tabelle 10:** Software

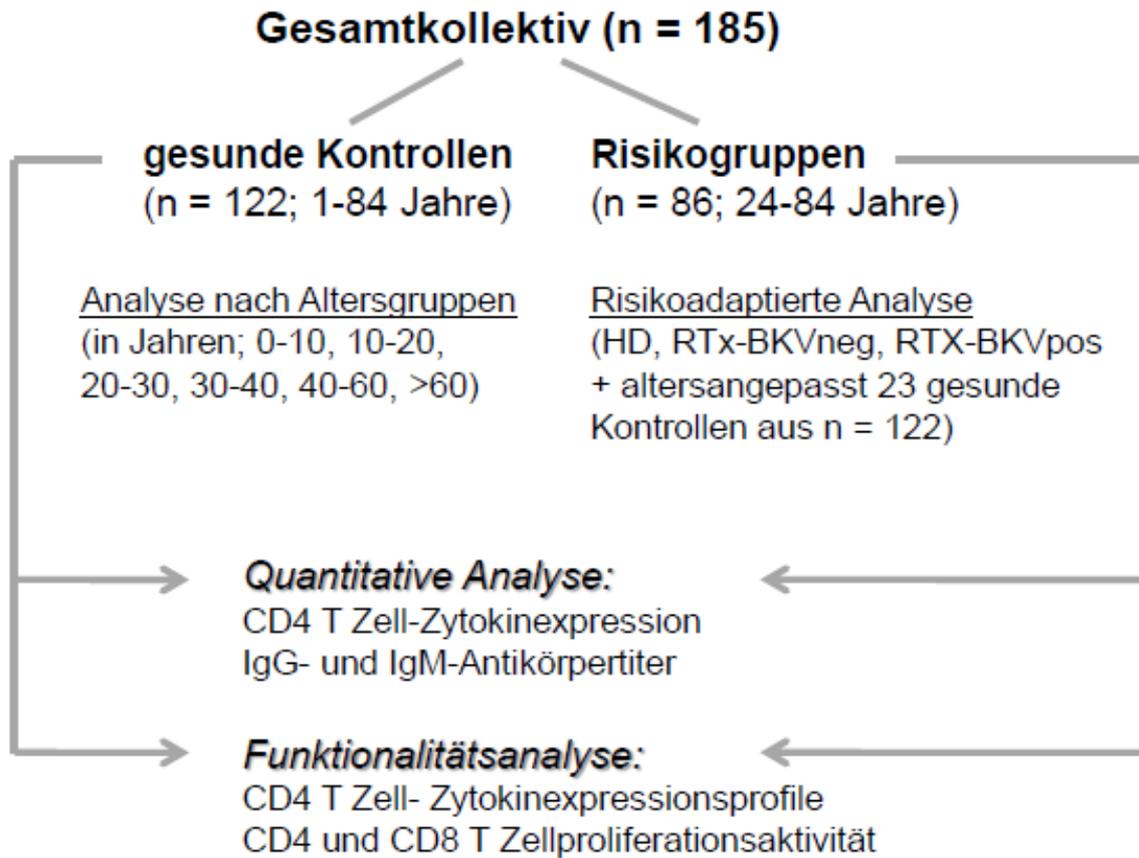
Software	Firma, Firmensitz
GraphPad Prism Version 5.02	GraphPad, La Jolla (San Diego, CA)
BD FACSDiva Software Version 6.1.3	BD Biosciences, Heidelberg
Microsoft Office	Microsoft, Redmond (USA)
Endnote X4	Adept Scientific GmbH, Frankfurt/Main

---

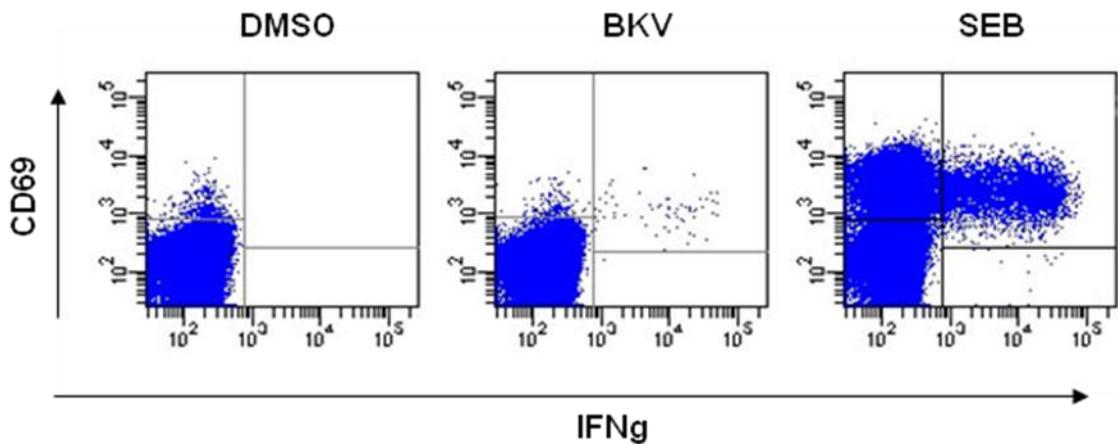
## 4 Ergebnisse

Zur Charakterisierung der Altersabhängigkeit der BKV-spezifischen T zellulären Immunantwort wurden zum einen immungesunde Kontrollpersonen hinsichtlich ihrer BKV-spezifischen Immunantwort untersucht. Diese wurde anschließend mit der zellulären BKV-spezifischen Immunität von Nierentransplantatempfängern mit oder ohne nachgewiesene/r BKV-Reaktivierung nach Transplantation verglichen. Ziel dessen war, Aussagen über deren Risiko der Ausbildung von Virus-assoziierten Komplikationen unter Immunsuppression treffen zu können. Als Vor-Transplantationskontrollen wurde zusätzlich ein Kollektiv von Hämodialysepatienten untersucht, welches im Zusammenhang mit ihrer chronischen Nierenerkrankung - wie die medikamentös immunsupprimierten Organempfänger - ebenfalls als immundefizient eingestuft wird.

Zur Charakterisierung der Funktionalität der detektierbaren BKV-spezifischen T Zellen wurde zum einen Zytokinexpressionsprofile der entsprechenden Zellpopulation untersucht. Mithilfe der Durchflusszytometrie ist es möglich, die Expression mehrerer Zytokine simultan zu messen und damit die entsprechenden Zytokin-exprimierenden T Zellpopulationen funktionell voneinander zu trennen und hinsichtlich ihrer immunologischen Funktion näher zu charakterisieren. Zum anderen wurde die Fähigkeit BKV-spezifischer T Zellen zur Proliferation untersucht. Der Auswertungsalgorithmus der BKV-spezifischen zellulären und humoralen Immunantwort sowie die jeweils untersuchten Probanden- und Patientenkollektive sind in Abbildung 3 dargestellt.



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung des Auswertungsalgorithmus der BKV-spezifischen zellulären und humoralen Immunantwort.



**Abbildung 4: Durchflusszytometrische Analyse der BKV-spezifischen CD69 positiven IFN $\gamma$ -produzierenden CD4 T Zellen.** Dargestellt sind die CD4 T Zellen aus dem Vollblut einer 24-jährigen Nierentransplantatempfängerin nach Stimulation mit dem Lösungsmittel DMSO als Negativkontrolle, überlappenden Peptiden von BKV-VP1 und BKV-Large T-Antigen sowie dem bakteriellen Superantigen SEB als Positivkontrolle nach der durchflusszytometrischen Messung. Aktivierte, CD69 positive IFN $\gamma$ -produzierende CD4 T Zellen zeigen sich jeweils im rechten oberen Quadranten der Diagramme (keine nachweisbaren aktivierten Zellen in der Negativkontrolle; in der BKV-Antigenprobe sowie in der Positivkontrolle sind aktivierte CD4 T Zellen deutlich nachweisbar).

#### **4.1 Durchflusszytometrischer Nachweis der BKV-spezifischen Immunität: errechneter Grenzwert IFN $\gamma$ -produzierender CD69 positiver CD4 T Zellen**

Zur Untersuchung der BKV-spezifischen T zellulären Immunantwort wurden ein durchflusszytometrischer Assay zur Analyse der spezifischen Zytokininduktion (Kurzzeitstimulation) aus Vollblutproben verwendet. Dazu wurde zum einen ein Gemisch aus überlappenden 15-ermer-Peptiden des BKV-Large T- und BKV-VP1-Antigens als Stimulanz der BKV-spezifischen Immunantwort und zum anderen das Lösungsmittel DMSO als Negativkontrolle sowie das polyklonale Superantigen SEB als Positivkontrolle eingesetzt.

Die Ko-Expression des Aktivierungsmarkers CD69 und des Zytokins IFN $\gamma$  nach 6-stündiger Stimulation der Vollblutproben diente dabei der Auslese spezifischer CD4 T Zellen aus der Gesamtpopulation aller messbaren T Zellen des jeweiligen Probanden. Abbildung 4 verdeutlicht als repräsentatives Beispiel, dass sich BKV-spezifische T Zellen mithilfe der Kurzzeitstimulation und den dabei eingesetzten BKV-Antigenen qualitativ nachweisen und anhand ihrer Funktionalität quantitativ detektieren lassen (hier 0,058%). Im Gegensatz dazu finden sich in der Negativkontrolle keine bzw. nur vereinzelte CD4 T Zellen (DMSO, rechter oberer Quadrant des Diagramms, hier 0,001%), während in der Positivkontrolle

---

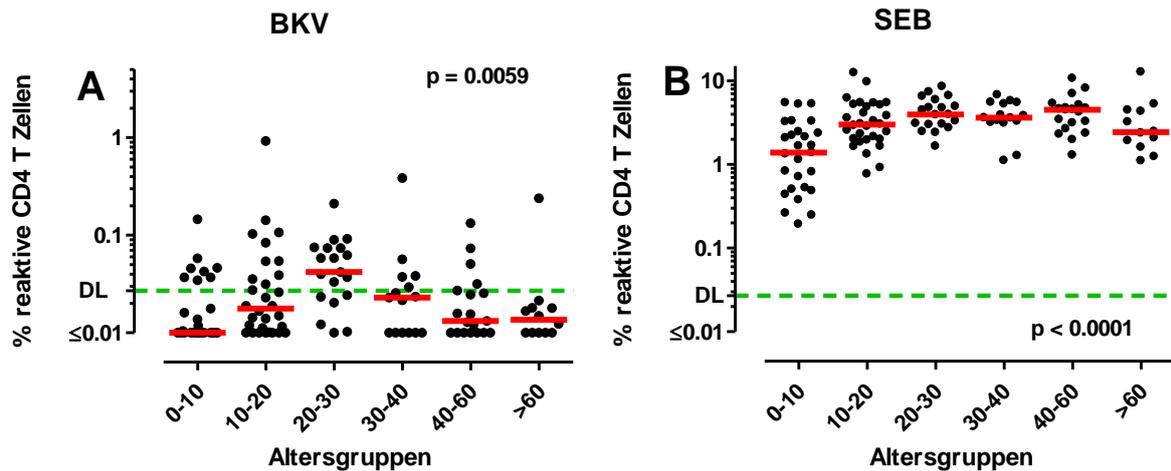
erwartungsgemäß eine große Subpopulation aktivierter CD4 T Zellen nachweisbar ist (SEB, rechter oberer Quadrant, hier 4,747%).

Der Grenzwert, welcher eine positive BKV-spezifische T zelluläre Immunantwort definiert, wurde anhand der natürlichen Streuung aller vorhandenen Messungen aus DMSO-versetzten Proben BKV-negativer Kontrollpersonen definiert. Dieser Grenzwert lässt auf der dargestellten Berechnungsgrundlage eine Unterscheidung derjenigen Personen mit BKV-spezifischer Immunabwehr nach stattgehabter Virusexposition von Virus-naiven Personen zu. Hierzu wurden die Negativkontrollen, das heißt nur mit dem Lösungsmittel DMSO als Stimulanz versetzte Proben, aller 351 bis zu diesem Zeitpunkt gemessenen Probanden (von denen insgesamt 185 in diese Arbeit eingeschlossen wurden) ausgewertet. Aus allen 351 Proben wurde ein Median des prozentualen Anteils reaktiver CD4 T Zellen an allen CD4 T Zellen mit 0,0031% berechnet. Jeder einzelne der bestimmten Werte für die Negativkontrollen, welcher oberhalb dieses errechneten Medians lag, wurde, nach vorheriger Logarithmierung, am logarithmierten Median gespiegelt. Anschließend wurde aus den oberhalb des Medians liegenden logarithmierten Ausgangswerten und den unterhalb liegenden, gespiegelten Werten der Mittelwert mit Standardabweichung bestimmt. Der errechnete Grenzwert ergab sich schließlich mit 0,027% durch die Summe aus diesem Mittelwert und der zweifachen Standardabweichung nach erfolgter Delogarithmierung. Lag demnach der Anteil BKV-spezifischer IFN $\gamma$ -produzierender CD69 positiver CD4 T Zellen bei  $\geq 0,027\%$  der Gesamtpopulation von CD4 T Zellen, war bei der untersuchten Person von einem stattgehabten Kontakt mit dem BK Virus auszugehen.

## **4.2 Altersabhängigkeit der BKV-spezifischen Immunantwort**

### **4.2.1 Quantitative Analyse reaktiver CD4 T Zellen und Antikörpertiter**

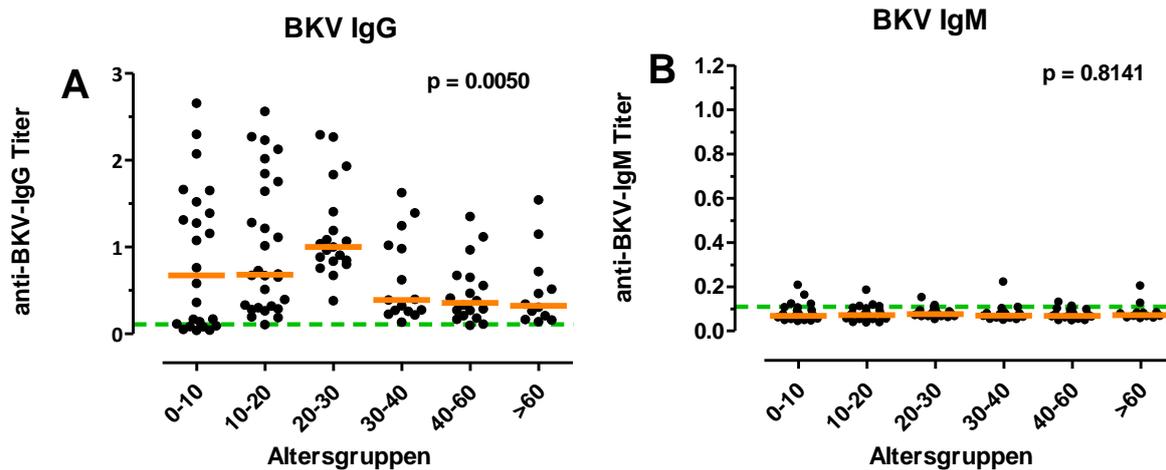
Zur näheren Charakterisierung der Altersabhängigkeit der BKV-spezifischen zellulären Immunantwort immungesunder Kontrollpersonen wurden 122 immungesunde Probanden in 6 Altersgruppen eingeteilt ( $>0$  bis  $\leq 10$  Jahre (27/122, 22,1%),  $>10$  bis  $\leq 20$  Jahre (30/122, 24,6%),  $>20$  bis  $\leq 30$  Jahre (19/122, 15,6%),  $>30$  bis  $\leq 40$  Jahre (15/122, 12,3%),  $>40$  bis  $\leq 60$  Jahre (19/122, 15,6%),  $>60$  Jahre (12/122, 9,8%)).



**Abbildung 5: Altersabhängigkeit der BKV-spezifischen T Zellantwort.** Darstellung der reaktiven CD4 T Zellen gegen BKV-Antigen (A) und gegen SEB als Positivkontrolle (B) aller 122 gesunder Kontrollen nach Altersgruppen. (DL = errechneter Grenzwert (0,027%) = hellgrün gestrichelte Linie, rot = Mediane)

Die Auswertung der BKV-spezifischen Immunantwort der 122 gesunden Kontrollen zeigte einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen dem Alter der Probanden und der Frequenz spezifischer reaktiver CD4 T Zellen ( $p < 0,0059$  für BKV, Abbildung 5A). Unter der Annahme einer BKV-Primärinfektion in der Kindheit wird dabei eine Zunahme der Frequenz BKV-spezifischer CD4 T Zellen vom Kindesalter bis in das junge Erwachsenenalter beobachtet. Maximale Frequenzen finden sich in der Altersgruppe der 20-30-jährigen, wo 68,4% der untersuchten Personen eine positive CD4 T zelluläre Immunantwort oberhalb des errechneten Grenzwerts zeigen. Des Weiteren liegt nur innerhalb dieser Gruppe der Median mit 0,042% oberhalb des errechneten Grenzwerts von 0,027%. Mit Beginn der dritten Altersdekade ist die messbare Anzahl BKV-spezifischer CD4 T Zellen erneut deutlich regredient (Abbildung 5A). Demgegenüber waren SEB-reaktive CD4 T Zellen bei allen Probanden nachweisbar. Auch diese zeigten einen Frequenzanstieg im frühen Kindesalter (Abbildung 5B).

Die Nachweisgrenze für das Vorliegen einer humoralen Immunität gegen BKV nach vorangegangenem Viruskontakt wurde durch die Arbeitsgruppe um Egli in umfangreichen Serumanalysen von 400 immungesunden Probanden bei  $OD_{492}$  0,110 festgelegt (EGLI et al., 2009a).  $OD_{492}$  bezeichnet dabei die bei einer Wellenlänge von 492 nm gemessene optische Dichte des untersuchten Materials. Innerhalb unserer Analysen liegen die Mediane der anti-BKV-IgG Titer in allen Altersgruppen der gesunden Kontrollen oberhalb der Nachweisgrenze von  $OD_{492}$



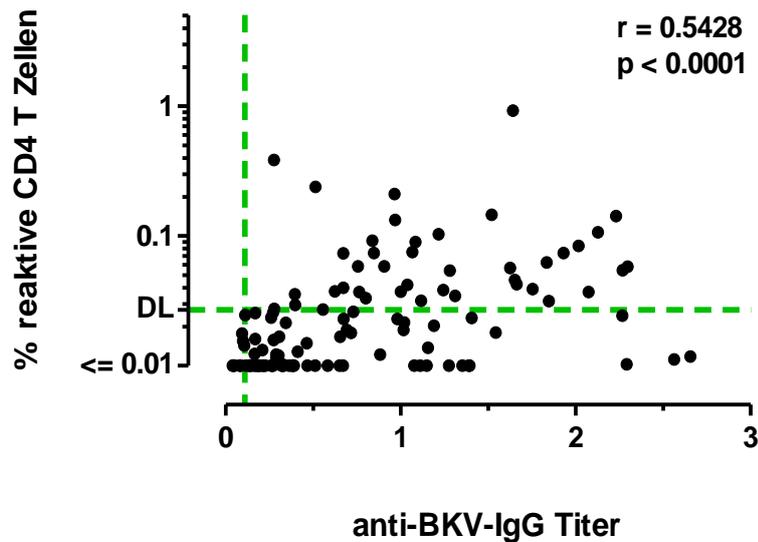
**Abbildung 6: Altersabhängigkeit der BKV-spezifischen humoralen Immunantwort.** Darstellung der BKV-spezifischen (A) IgG Titer und (B) IgM Titer aller 122 gesunden Kontrollen nach Altersgruppen. Die hellgrün gestrichelte Linie markiert den Grenzwert der positiven serologischen Immunantwort (Nachweisgrenze OD<sub>492</sub> 0,110) (EGLI et al., 2009a), orange = Mediane.

0,110 als Ausdruck der aus der Literatur bekannten sehr hohen BKV-Durchseuchungsrate in der Allgemeinbevölkerung.

Wie für die Fraktion der reaktiven BKV-spezifischen CD4 T Zellen gezeigt (Abbildung 5A) finden sich die höchsten BKV-IgG-Antikörpertiter ebenso in der Altersgruppe der 20-30-jährigen (Median OD<sub>492</sub> 0,4681). Auch hier sind die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen von statistischer Signifikanz ( $p = 0,0050$ , Abbildung 6A).

Eine anti-BKV-IgM-Seropositivität ist innerhalb der gesunden Kontrollen nur in 6 von 122 Fällen (4,9%) nachweisbar. In allen Altersgruppen liegt der Median der IgM-Antikörpertiter unterhalb der Nachweisgrenze (maximaler Median OD<sub>492</sub> 0,0762 in der Gruppe der 20-30-jährigen) als Ausdruck fehlender akuter BKV-Primärinfektionen oder -Reaktivierungen der untersuchten Kollektive zum Zeitpunkt der Messungen. Die Unterschiede zwischen den Altersgruppen sind zudem nicht statistisch signifikant ( $p = 0,8141$ , Abbildung 6B).

Der oben beschriebene Zusammenhang zwischen den detektierbaren BKV-spezifischen CD4 T Zellen und den entsprechenden anti-BKV-IgG Titern in der Gruppe der 20-30-jährigen gesunden Kontrollen (19/122, 15,6%) spiegelt sich in der durchgeführten Korrelationsanalyse dieser Messgrößen wider: es lässt sich ein deutlicher linearer Zusammenhang zwischen den spezifischen CD4 T Zellen und den spezifischen Antikörpertitern innerhalb des Kollektivs der 122 gesunden Kontrollen nachweisen (Korrelationskoeffizient  $r = 0,5428$ ). Diese Korrelation ist von statistischer Signifikanz ( $p < 0,0001$ , Abbildung 7).

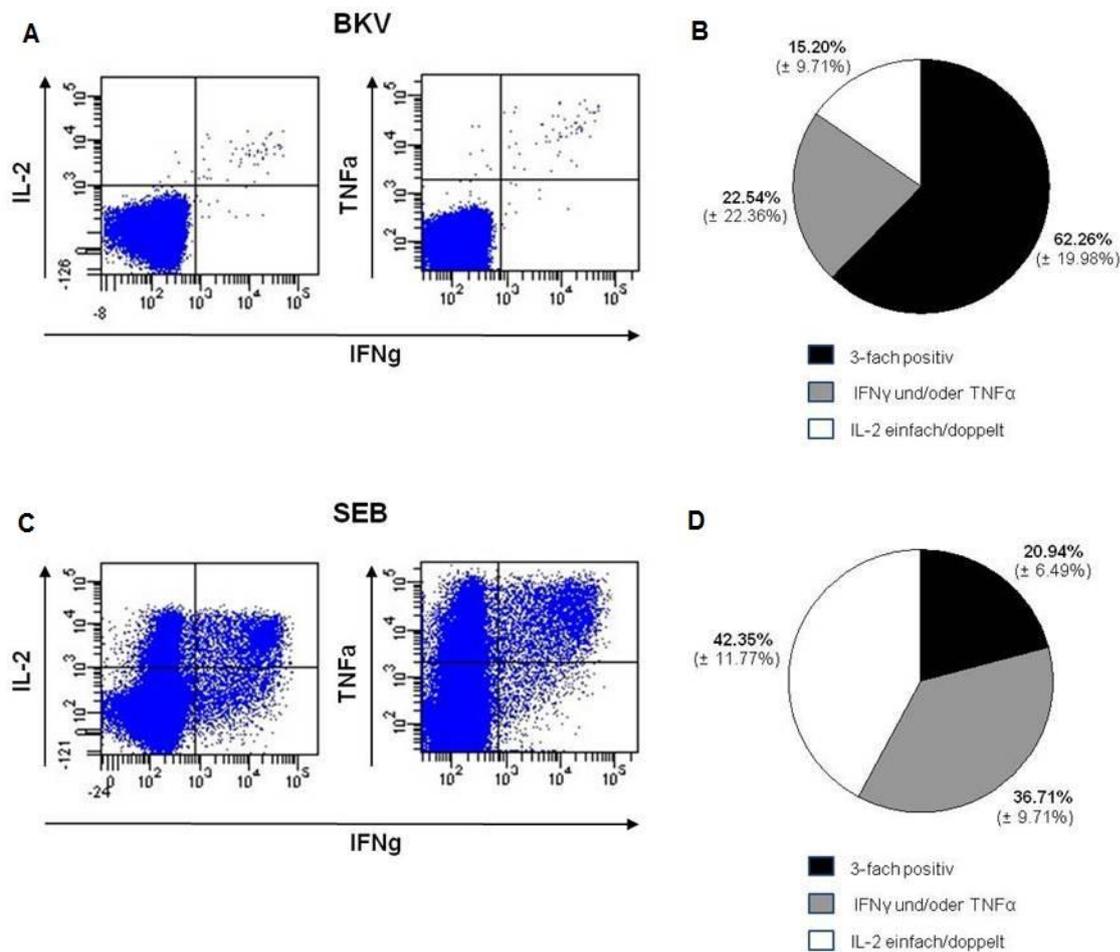


**Abbildung 7: Korrelation der reaktiven CD4 T Zellen mit den BKV-IgG-Antikörpertitern im Serum.** Die hellgrün gestrichelte vertikale Linie markiert die Antikörpernachweisgrenze von OD<sub>492</sub> 0,110, die hellgrün gestrichelte horizontale Linie den errechneten CD4 T Zellgrenzwert von 0,027%.

## 4.2.2 Funktionalität der detektierbaren reaktiven CD4 T Zellen

### 4.2.2.1 Zytokinexpressionsprofile

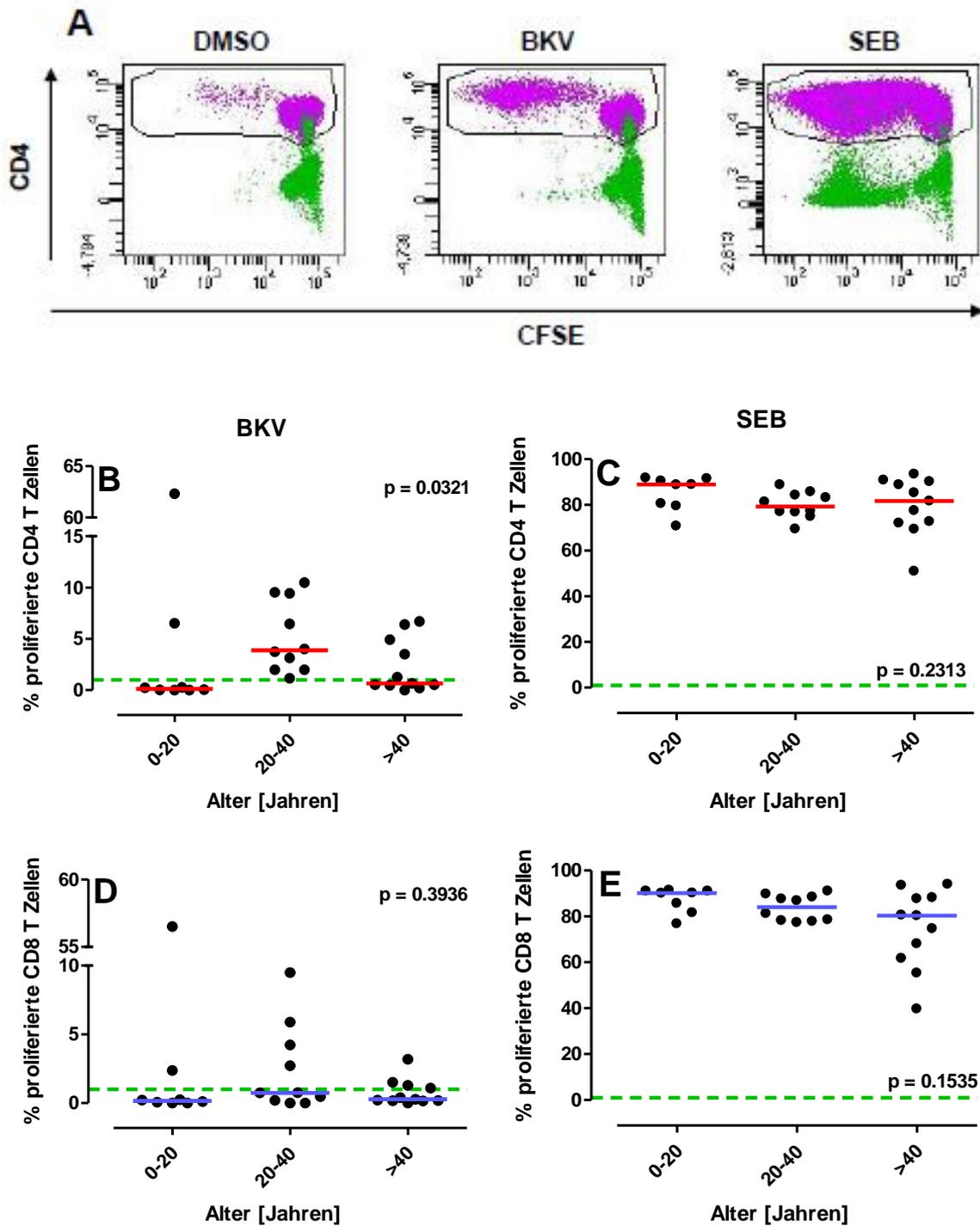
Der Anteil dreifach Zytokin-positiver CD4 T Zellen an der Fraktion detektierbarer BKV-spezifischer CD4 T Zellen ist innerhalb des Kollektivs gesunder Kontrollen am größten. Sie produzieren die Zytokine IFN $\gamma$  sowie gleichzeitig IL-2 und TNF $\alpha$ . Repräsentative Messungen BKV- und SEB-reaktiver CD4 T Zellen eines gesunden Probanden sind in Abbildung 8A und C gezeigt. Der Anteil dreifachpositiver BKV-spezifischer CD4 T Zellen ist innerhalb der untersuchten gesunden Kontrollen mit 62,26%  $\pm$  19,98% größer als der Anteil IFN $\gamma$ -einfach- und IFN $\gamma$ -TNF $\alpha$ -doppelt positiver (22,54%  $\pm$  22,36%) bzw. IL-2-einfach- und IL-2-IFN $\gamma$ -doppelt positiver CD4 T Zellen (15,20%  $\pm$  9,71%, Abbildung 8B). Diese Verteilung unterschied sich deutlich von dem Zytokinprofil SEB-reaktiver CD4 T Zellen, bei denen der Anteil dreifach-positiver Zellen am geringsten war (Abbildung 8D).



**Abbildung 8: Dominanz multifunktionaler BKV-spezifischer T Zellen bei Immungesunden.** Durchflusszytometrische und prozentuale quantitative Darstellung der CD4 T zellulären singulären bzw. simultanen Expression von IL-2, TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  nach BKV Stimulation (A/B) und SEB-Stimulation (C/D) innerhalb des Kollektivs gesunder Kontrollen (n = 122).

#### 4.2.2.2 Proliferation spezifischer T Zellen

Neben der Analyse der Zytokinprofile BKV-spezifischer T Zellen wurde zudem deren Fähigkeit zur Proliferation charakterisiert. Abbildung 9A zeigt ein repräsentatives Beispiel einer Messung, in der die proliferierten reaktiven CD4 T Zellen aus dem Vollblut einer 59-jährigen Nierentransplantatempfängerin nach Anlage von Zellkulturen mit den Stimulanzen DMSO als Negativkontrolle, überlappenden Peptiden von BKV-VP1 und BKV-Large T-Antigen sowie SEB als Positivkontrolle, dargestellt sind. Der Anteil proliferierender Zellen aus der Gesamtlymphozytenpopulation ist durch Abnahme der CFSE-Fluoreszenz abgrenzbar und wurde zudem sowohl für CD4 als auch für CD8 T Zellen gemessen.



**Abbildung 9: Durchflusszytometrische Analyse der Proliferation BKV-spezifischer T Zellen.** Repräsentative Messung der Proliferation anhand der Abnahme des CFSE-Signals (A). Darstellung des prozentualen Anteils proliferierter reaktiver CD4 T Zellen (B/C) und CD8 T Zellen (D/E) von 29 immungesunden Kontrollpersonen nach Stimulanz (BKV-Antigen (B/D), Positivkontrolle SEB (C/E)) und Altersgruppen. Die hellgrün gestrichelten Linien markieren die Nachweisgrenze der aktiven Proliferation, welche bei der Positivkontrolle SEB bei 0%, d.h. es proliferieren nur reaktive T Zellen, und bei dem BKV-Antigen bei 1% (um falsch positive Ergebnisse, z.B. durch Verunreinigungen, zu vermeiden) liegt. (rot/blau = Mediane) (CFSE = Carboxy-Fluorescein-Succinimidyl-Ester)

---

Zur besseren Vergleichbarkeit und zur Analyse einer Altersabhängigkeit wurden die mittels Proliferationsanalyse untersuchten 29 gesunden Kontrollen in 3 Altersgruppen eingeteilt (0-20 Jahre (8/29, 27,6%), 20-40 Jahre (10/29, 34,5%), >40 Jahre (11/29, 37,9%).

Dabei ist die Proliferationsfähigkeit nach entsprechender Stimulation der detektierbaren BKV-spezifischen CD4 T Zellen in der Altersgruppe der 20-40-jährigen jungen Erwachsenen signifikant größer (Median 3,8867%) als in der Gruppe der 0-20-jährigen bzw. der älter als 40-jährigen gesunden Kontrollen ( $p = 0,0321$ , Abbildung 9B), während keine Unterschiede in der Proliferation SEB reaktiver CD4 T Zellen zu detektieren waren (Abbildung 9C).

Für die BKV-spezifischen CD8 T Zellen konnte im Gegensatz zu den reaktiven CD4 T Zellen lediglich eine Tendenz zu höheren Proliferationsleveln in der Altersgruppe der 20-40-jährigen nachgewiesen werden, der Median liegt mit 0,7492% unterhalb der Nachweisgrenze von 1%. Die Altersgruppen unterscheiden sich weder nach BKV- ( $p = 0,3936$ , Abbildung 9D) noch nach SEB-Stimulation (Abbildung 9E).

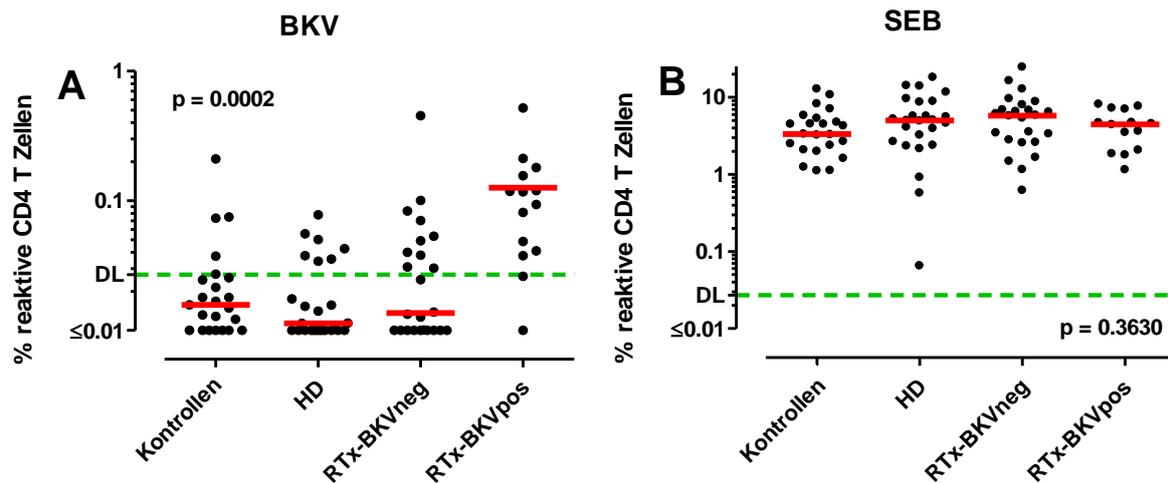
### **4.3 Risikoadaptierte Analyse der BKV-spezifischen Immunantwort**

#### **4.3.1 Quantitative Analyse reaktiver CD4 T Zellen und Antikörpertiter**

Zur Beurteilung des Einflusses einer stattgehabten BKV-Reaktivierung unter medikamentöser Immunsuppression nach Nierentransplantation auf die BKV-spezifische zelluläre Immunantwort wurden Vollblutproben von insgesamt 86 Probanden untersucht: 24/86 (27,9%) Nierentransplantatempfänger ohne stattgehabte BKV-Reaktivierung nach oben beschriebener Definition (siehe 3.6.2) und 14/86 (16,3%) Nierentransplantatempfänger mit nachgewiesener BKV-Reaktivierung nach o.b. Definition (siehe 3.6.2). Zudem wurden 25 (29,1%) Hämodialysepatienten als Prä-Transplantationskontrollen sowie 23 (26,7%) gesunde Kontrollen aus dem Gesamtkollektiv der 122 gesunden Kontrollpersonen Altersangepasst hinzugezogen (siehe Tabelle 9).

Hierbei zeigen Nierentransplantatempfänger nach klinisch relevanter BKV-Problematik die höchsten CD4 T Zellfrequenzen im Vergleich mit den anderen Risikogruppen. Nur innerhalb dieses Kollektivs liegt der Median mit 0,1053% oberhalb des errechneten Grenzwerts von 0,027%. Bei Nierentransplantatempfänger ohne stattgehabte BKV-Komplikation finden sich im Median 0,014% reaktive

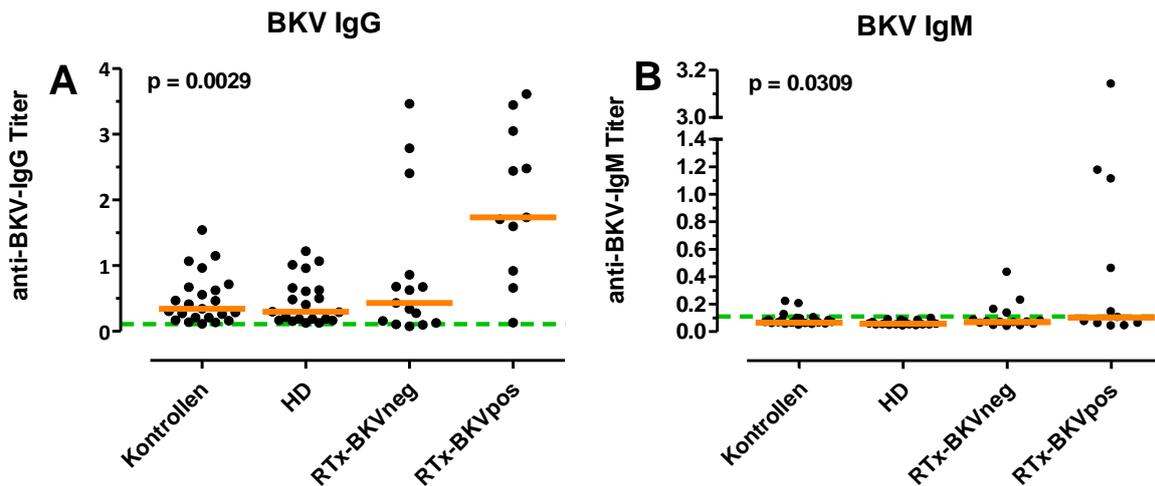
CD4 T Zellen, bei Hämodialysepatienten mit im Median 0,011% die niedrigste Frequenz BKV-spezifischer CD4 T Zellen und bei den gesunden Kontrollen im Median 0,016%. Dabei sind die Unterschiede zwischen den untersuchten Kollektiven von statistischer Signifikanz ( $p = 0,0002$ , Abbildung 10A), während keine Unterschiede in der Frequenz SEB-reaktiver CD4 T Zellen detektierbar waren (Abbildung 10B).



**Abbildung 10: Hohe Frequenz BKV-spezifischer CD4 T Zellen bei Patienten mit BKV-Reaktivierung.** Graphische Darstellung des Anteils reaktiver CD4 T Zellen gegen BKV als Stimulanz (A) sowie gegen die Positivkontrolle SEB (B) in den einzelnen Kollektiven gesunde Kontrollen (Kontrollen,  $n = 23$ ), Hämodialysepatienten (HD,  $n = 25$ ) und Nierentransplantatempfänger ohne (RTx-BKVneg,  $n = 24$ ) bzw. mit klinisch relevanter BKV-Reaktivierung (RTx-BKVpos,  $n = 14$ ). (DL = errechneter Grenzwert (0,027%), rot = Mediane)

Auch die parallel bestimmten BKV-spezifischen IgG-Antikörpertiter demonstrieren den Zusammenhang zwischen der detektierbaren BKV-spezifischen Immunität und einer vorangegangenen BKV-Reaktivierung (Abbildung 11A). Bei Nierentransplantatempfängern mit einer stattgehabten BKV-Reaktivierung (11/71 (15,5%)) lassen sich statistisch signifikant höhere anti-BKV-IgG-Titer nachweisen (Median  $OD_{492}$  0,8861;  $p = 0,0029$ ) als bei Nierentransplantatempfängern ohne BKV-Problematik in der Vergangenheit (15/71 (21,1%), Median  $OD_{492}$  0,2643), den immunologisch gesunden Kontrollen (23/71 (32,4%), Median  $OD_{492}$  0,1568) oder den Hämodialysepatienten (22/71 (31,0%), Median  $OD_{492}$  0,1630).

Die detektierbaren anti-BKV-IgM Titer stellten sich mit einer Tendenz zu höheren Antikörperleveln in der Gruppe der Nierentransplantatempfänger mit nachgewiesener BKV-Reaktivierung im Vergleich zu den anderen Kollektiven dar, der Median lag mit



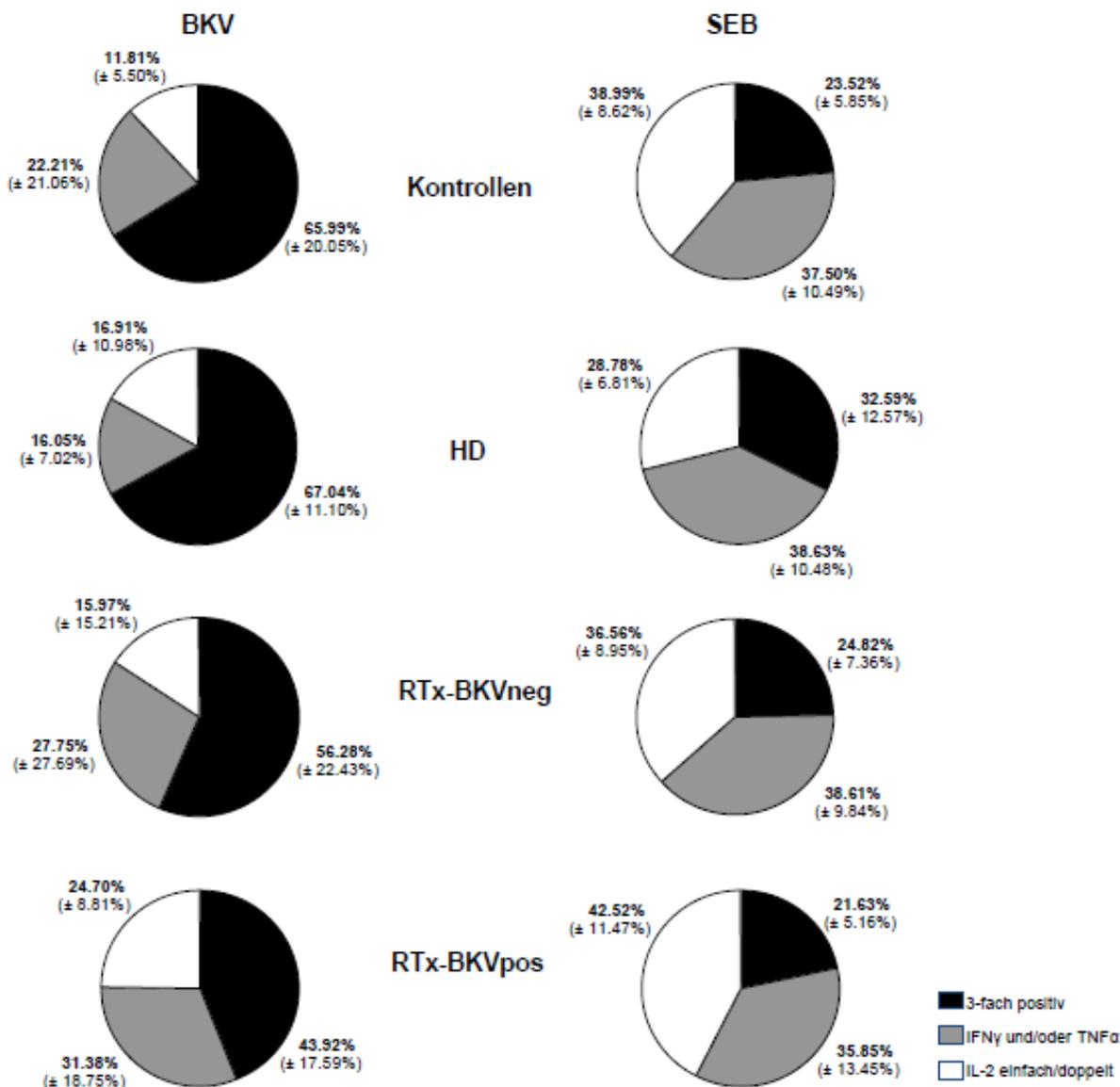
**Abbildung 11: Hohe Antikörpertiter bei Patienten mit BKV-Reaktivierung.** Graphische Darstellung der BKV-spezifischen IgG- (A) und IgM- (B) Antikörpertiter in den einzelnen Kollektiven gesunde Kontrollen (Kontrollen, n = 23), Hämodialysepatienten (HD, n = 22) und Nierentransplantatempfänger ohne (RTx-BKVneg, n = 15) bzw. mit klinisch relevanter BK Virus-Reaktivierung (RTx-BKVpos, n = 11). (hellgrün gestrichelte Linie = Grenzwert der positiven serologischen Immunantwort (Nachweisgrenze OD<sub>492</sub> 0,110) (EGLI et al., 2009a), orange = Mediane)

OD<sub>492</sub> 0,1041 knapp oberhalb der Nachweisgrenze einer akuten oder subakuten BKV-Problematik (Nierentransplantatempfänger ohne BKV-Reaktivierung Median OD<sub>492</sub> 0,0692, Hämodialysepatienten Median OD<sub>492</sub> 0,0568, gesunde Kontrollen Median OD<sub>492</sub> 0,0664, Abbildung 11B). Vier der 11 Probanden im Kollektiv der Nierentransplantatempfänger nach BKV-Problematik zeigten eine BKV-spezifische IgM-Aktivität deutlich und einer der 11 Probanden knapp oberhalb der festgelegten Grenze von OD<sub>492</sub>. Diese Messergebnisse könnten Ausdruck einer zeitlichen Latenz von weniger als vier Wochen zu der klinisch manifesten BKV-Reaktivierung der entsprechenden Nierentransplantatempfänger sein. Die Unterschiede zwischen den untersuchten Kollektiven zeigten in diesem Zusammenhang statistische Signifikanz (p = 0,0309).

#### 4.3.2 Funktionalität der detektierbaren reaktiven CD4 T Zellen bei Risikokollektiven

##### 4.3.2.1 Zytokinexpressionsprofile

Interessanterweise war der Anteil der multifunktionalen dreifach Zytokin-positiven CD4 T Zellen an den detektierbaren BKV-spezifischen CD4 T Zellen mit 43,92% ± 17,59 bei Nierentransplantatempfängern mit vorangegangener BKV-Reaktivierung (14/86 (16,3%)) am geringsten im Vergleich zu den Nierentransplantatempfängern



**Abbildung 12: Verlust multifunktionaler BKV-spezifischer CD4 T Zellen bei Patienten mit BKV-Reaktivierung.** Zytokinprofile mit Darstellung des prozentualen Anteils (mit Standardabweichung) der IL-2 einfach oder doppelt (weiß), IFN $\gamma$ - und/oder TNF $\alpha$ -einfach oder doppelt (grau) sowie der IL-2- IFN $\gamma$ -TNF $\alpha$ - dreifach positiven (schwarz) CD4 T Zellen an der Gesamtheit der detektierbaren BKV- und SEB-spezifischen CD4 T Zellen unterteilt nach den einzelnen Risikogruppen (Nierentransplantatempfänger ohne nachgewiesene BK Virämie und Nierentransplantatempfänger mit nachgewiesener BK Virämie) und Kontrollen (Kontrollen, Hämodialysepatienten (HD)).

ohne nachweisbare BKV-Reaktivierung (24/86 (27,9%)) mit 56,28%  $\pm$  22,43% IFN $\gamma$ -TNF $\alpha$ -IL-2-positiven CD 4 T Zellen, den Hämodialysepatienten (25/86 (29,1%)) mit 67,04%  $\pm$  11,10 und den gesunden Kontrollen (23/86 (26,7%)) mit 65,99%  $\pm$  20,05% IFN $\gamma$ -TNF $\alpha$ -IL-2-positiven CD4 T Zellen (Abbildung 12).

Die Ergebnisse zeigen, dass diese Abnahme dreifach Zytokin-positiver CD4 T Zellen mit einer Zunahme der IFN $\gamma$ - und/oder TNF $\alpha$ -einfach oder doppelt positiven CD4 T Zellen (31,38%  $\pm$  18,75) bzw. IL-2 einfach oder doppelt positiven CD4 T Zellen

---

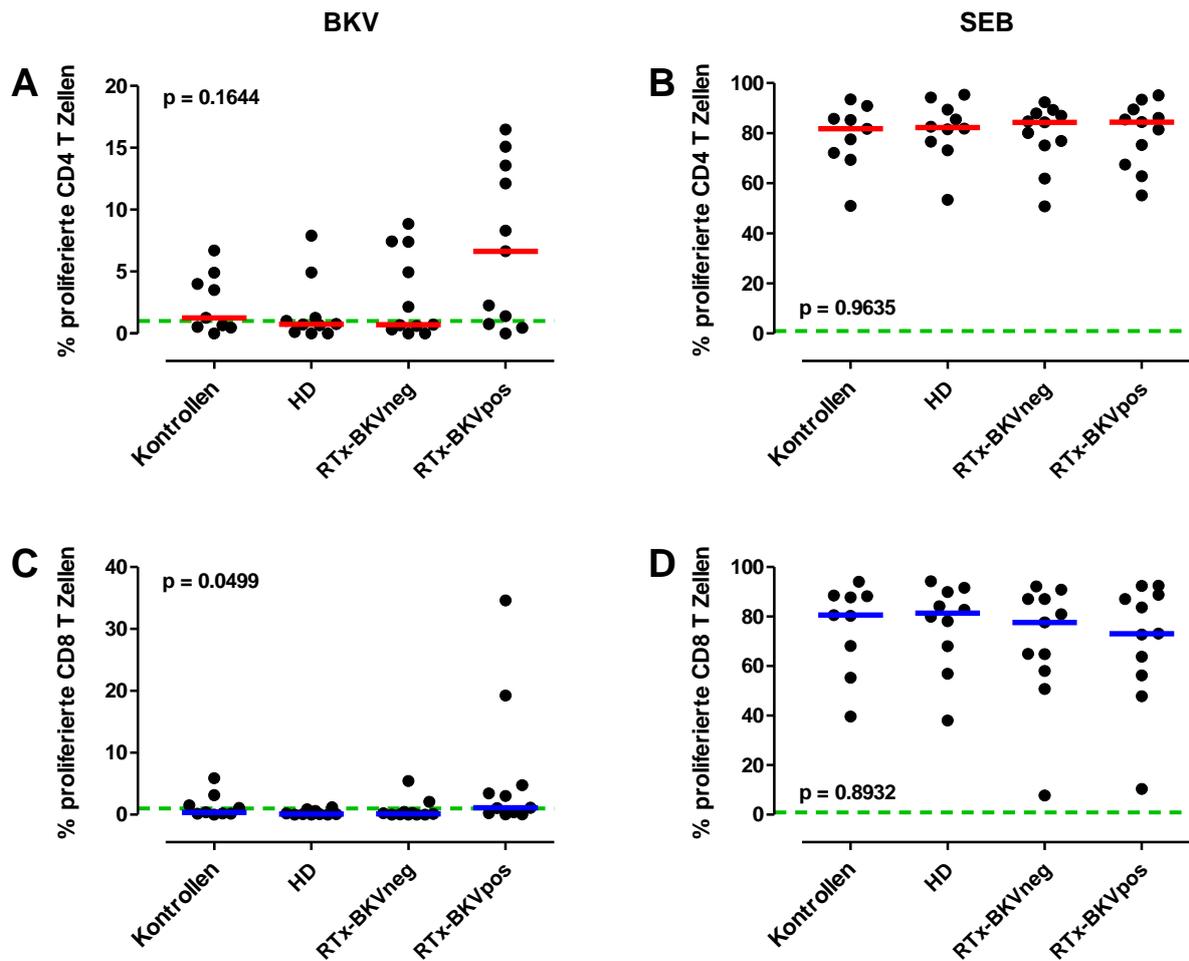
(24,70% ± 8,81) nach klinisch manifester BKV-Problematik vergesellschaftet zu sein scheint.

#### **4.3.2.2 Proliferation spezifischer T Zellen**

Beim Vergleich der BKV-spezifischen Proliferation zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Risikogruppen (CD4  $p = 0,1644$ ; CD8  $p = 0,0499$ , Abbildung 13).

Die Proliferationsaktivität der BKV-spezifischen CD4 T Zellen ist bei Nierentransplantatempfängern nach stattgehabter BKV-Reaktivierung mit im Median 6,638% deutlich höher als bei denen ohne BKV-Reaktivierung (Median 0,7103%), den Hämodialysepatienten (Median 0,7552%) und den gesunden Kontrollen (Median 1,2725%), wobei dieser Unterschied weder nach BKV Stimulation (Abbildung 13A) noch nach SEB Stimulation statistische Signifikanz erreicht (Abbildung 13B).

Spezifische CD8 T Zellen zeigen lediglich ein Trend zu höheren Proliferationsleveln in der Gruppe der Nierentransplantatempfänger mit nachgewiesener BKV-Reaktivierung (Median 1,147%) im Vergleich zu den restlichen Gruppen (Nierentransplantatempfänger ohne BKV-Reaktivierung Median 0,1135%, Hämodialysepatienten Median 0,1049%, Kontrollen Median 0,3924%, Abbildung 13C). Demgegenüber waren keine signifikanten Unterschiede in der Proliferation SEB-reaktiver CD8 T Zellen zu beobachten (Abbildung 13D).



**Abbildung 13: Keine Unterschiede in der BKV-spezifischen T Zellproliferation.** Darstellung des prozentualen Anteils proliferierter reaktiver CD4 T Zellen (A/B) oder CD8 T Zellen (C/D) nach Stimulation mit BKV-Antigen (A/C) oder der Positivkontrolle SEB (B/D) bei Risikogruppen (RTx-BKVneg n = 11, RTx-BKVpos n = 11) und Kontrollen (Immungesunde Kontrollen n = 9, HD n = 10). Die hellgrün gestrichelten Linien markieren die Nachweisgrenze der aktiven Proliferation, welche bei der Positivkontrolle SEB bei 0%, d.h. es proliferieren nur reaktive T Zellen, und bei dem BKV-Antigen bei 1% (um falsch positive Ergebnisse, z.B. durch Verunreinigungen, zu vermeiden) liegt. (rot = Mediane)

---

## 5 Diskussion

Die BK Virusreplikation ist eine der infektiösen Hauptkomplifikationen in der Nachsorge immunsupprimierter Nierentransplantatempfänger, die zu einer vorzeitigen Transplantatfunktionsverschlechterung in mehr als 50% der beschriebenen Fälle führt (HIRSCH, STEIGER, 2003; HIRSCH et al., 2005; VASUDEV et al., 2005). Im Gegensatz dazu verursacht das BK Virus keine relevanten Schäden bei immunkompetenten Personen, obwohl auch bei diesen in regelmäßigen Abständen Reaktivierungen begleitet von leichten Virurien auftreten (POLO et al., 2004; ZHONG et al., 2007).

Ziel dieser Arbeit war zum einen eine detaillierte quantitative sowie funktionelle Charakterisierung BKV-spezifischer T Zellen immungesunder Personen. Hierzu wurde eine große Kohorte mit weiten Altersgrenzen untersucht. Grundlage der spezifischen Immunität ist die weltweit sehr hohe BKV-Durchseuchungsrate innerhalb der Bevölkerung mit mehr als 90% im Kindes-, Jugend- und jungen Erwachsenenalter und immer noch ca. 80% der Erwachsenen (KNOWLES et al., 2003). Dabei weisen 20- bis 30-jährige gesunde Personen maximale Level BKV-spezifischer CD4 T Zellen auf, die mit zunehmendem Lebensalter wieder kontinuierlich fallen, bis weit unter die Nachweisgrenze in vielen älteren getesteten Individuen. Die messbaren BKV-spezifischen Antikörpertiter der untersuchten Personen verhalten sich gleichsinnig, in Übereinstimmung mit der hierzu bislang veröffentlichten Literatur (KNOWLES et al., 2003; EGLI et al., 2009a).

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind dahingehend von besonderem klinischen Interesse, als dass sie einen Zusammenhang zwischen der abnehmenden BKV-spezifischen Immunität und einer gesteigerten Vulnerabilität von Nierentransplantatempfängern gegenüber BKV-assoziierten Komplikationen im Alter nahelegen. Dieser konnte sowohl in großen Single-center Studien (RAMOS et al., 2002), Registeranalysen (DHARNIDHARKA et al., 2009) und auch zuletzt im Rahmen einer prospektiven, randomisierten, kontrollierten klinischen Studie, in der eine Tacrolimus- mit einer Cyclosporin-basierten Immunsuppression nach Erstnierentransplantation verglichen wurde (HIRSCH et al., 2013), belegt werden. Das allgemein bessere Ansprechen jüngerer transplantierte Patienten auf eine Reduktion der medikamentösen Immunsuppression als antivirale Therapie der ersten Wahl resultiert möglicherweise ebenfalls aus den Alters-abhängig höheren

---

Frequenzen eigener BKV-spezifischer T Zellen zum Zeitpunkt der Transplantation und aus deren besserer Proliferationskapazität. Dies mag hingegen nicht für die insgesamt geringe Zahl an BKV-naiven Patienten zutreffen, welche erst nach der Transplantation die Primärinfektion durchmachen und folglich erst dann eine spezifische Immunantwort aufbauen.

Zum anderen konnte diese Arbeit zeigen, dass Nierentransplantatempfänger im Zustand nach klinisch relevanter BKV-Problematik unter medikamentöser Immunsuppression zum Zeitpunkt der Messungen signifikant höhere Frequenzen BKV-spezifischer CD4 T Zellen und Antikörper aufweisen als Alters-angepasste gesunde Kontrollpersonen, Hämodialysepatienten und auch Nierentransplantatempfänger ohne bisherige BKV-assoziierte Komplikation. Bemerkenswert dabei ist, dass diese Überzahl an spezifischen T Zellen nicht, wie bei immungesunden Personen, zum Großteil multifunktional ist, sondern der Anteil dieser dreifach Zytokin-positiven CD4 T Zellen bei Organempfängern nach relevanter BKV-Problematik sogar signifikant geringer ist. Hieraus lässt sich die besondere Bedeutung einer intakten T Zellfunktion in der Kontrolle der BK Viruslast ableiten.

Der nachgewiesene Alters-abhängige Verlauf spezifischer Antikörpertiter steht im Einklang mit den Ergebnissen hierzu bisher veröffentlichter Arbeiten mit Kindern und Erwachsenen, welche allesamt eine generell niedrige Prävalenz BKV-spezifischer Antikörper bei Kindern zeigten (GINEVRI et al., 2007; BODAGHI et al., 2009; ALI et al., 2011). Die Erwachsenen wiesen die höchsten Antikörpertiter bei den 20-40-jährigen Probanden auf, die mit weiter steigendem Lebensalter dann wieder abnahmen (KNOWLES et al., 2003; EGLI et al., 2009a). Des Weiteren scheint ein proportionaler Zusammenhang zwischen der quantitativen BKV-Replikation und den spezifischen IgG und insbesondere auch IgM Titern bei Nierentransplantatempfängern zu bestehen (RANDHAWA et al., 2006; GINEVRI et al., 2007; BOHL et al., 2008; SCHACHTNER et al., 2011).

Quantitative Messungen von Frequenz und Funktionalität der spezifischen T Zellen sind, ebenso wie Grenzwerte, nicht direkt vergleichbar, da die entsprechenden bislang durchgeführten Studien zur zellulären Immunität sehr heterogen sind in Bezug auf Studiendesign, Auswertung, Probenmaterial, verwendete Stimulanzien, Stimulationszeitraum und/oder Patientensubgruppenanalyse (BABEL et al., 2011). Dennoch scheint es auch hier einen positiven Zusammenhang zwischen der BKV-

---

Replikation und -spezifischen T Zellfrequenzen zu geben (GINEVRI et al., 2007; SCHACHTNER et al., 2011; SCHACHTNER et al., 2013). Dabei richtet sich die T Zellantwort bei Transplantierten, der aktuellen Literatur zufolge, vorrangig gegen strukturelle (Oberflächen-)Antigene wie VP1–3 (SCHACHTNER et al., 2011; SCHACHTNER et al., 2013). Anscheinend ist die höhere Frequenz BKV-spezifischer T Zellen auf höhere lokale und/oder systemische Virusreplikationslevel zurückzuführen. Demgegenüber könnte die intermittierend nachweisbare leichte Virurie bei immunkompetenten Personen (POLO et al., 2004; ZHONG et al., 2007) die kontinuierlich rückläufige BKV-spezifische T Zellantwort mit zunehmendem Lebensalter, und damit Abstand zur Primärinfektion, erklären. Somit würde die quantitative spezifische Immunität indirekt die Virusbelastung des Individuums durch das Ausmaß der viralen Replikation widerspiegeln.

Bekanntermaßen zeigt BKV einen Tropismus für renale Tubulusepithelzellen und verwendet deren Wirtspolymerase für seine Replikation (HIRSCH, STEIGER, 2003). Demzufolge stünde die Virusvermehrung in direktem Zusammenhang mit der Regenerationskapazität dieses Zelltyps. Bei heranwachsenden immungesunden Personen ist diese am stärksten ausgeprägt. Bei Erwachsenen tritt eine solche Hyperregeneration epithelialer Tubuluszellen dahingegen häufig im Zusammenhang mit Ischämie und Reperfusionsschaden, beispielsweise nach Nierentransplantation, auf. Möglicherweise kommt es dadurch begleitend zur gesteigerten Virusreplikation mit systemischer Ausbreitung, aggraviert durch die obligate Einnahme immunsuppressiver Medikamente. Der bei BKV nachweisbare Alters-abhängige Rückgang der Antigen-spezifischen T zellulären Immunität konnte bereits für andere persistierende Pathogene, wie z.B. dem Varizella zoster Virus, gezeigt werden (SADAOKA et al., 2008; WEINBERG et al., 2010; SCHUB et al., 2014). Dort führte eine Reexposition älterer Erwachsener mittels Zoster-Schutzimpfung zu einer erneuten Induktion einer signifikanten T Zellantwort (WEINBERG et al., 2010). Durch eine wiederholte Auseinandersetzung mit dem Pathogen kann also möglicherweise auch auf das BK Virus eine effektive sowohl humorale als auch zelluläre Immunantwort, unabhängig vom Lebensalter, reetabliert werden.

In dieser Arbeit war der Anteil BKV-spezifischer T Zellen zum einen in der Gruppe immungesunder junger Erwachsener und zum anderen in der der immunsupprimierten Nierentransplantatempfänger nach klinisch relevanter BKV-

---

Problematik am höchsten messbar. Diese Zellen unterscheiden sich jedoch deutlich in ihrer Funktionalität. Die Nierentransplantatempfänger zeigen dahingehend einen signifikanten Verlust dreifach Zytokin-positiver sowie deutlichen Anstieg einfach Zytokin-exprimierender CD4 T Zellen.

Man weiß bereits, dass die T zelluläre Multifunktionalität eine entscheidende Rolle in der Abwehr klinisch relevanter Infektionen mit z.B. *Mykobakterium tuberculosis*, Influenzavirus, mit dem humanen Immundefizienzvirus (HIV), Hepatitis C Virus oder Cytomegalievirus spielt (SEMMO et al., 2005; KANNANGANAT et al., 2007a; KANNANGANAT et al., 2007b; SEDER et al., 2008; SESTER et al., 2008; SESTER et al., 2011; SCHMIDT et al., 2012). Dass man BKV-spezifische T Zellen anhand ihrer Zytokinexpressionsmuster und Funktionalität verschiedenen Phasen der viralen Replikation und ihnen damit einer mögliche Funktion in der Viruselimination zuordnen kann, wurde in ähnlicher Weise auch für CD154-exprimierende IFN $\gamma$ -TNF $\alpha$ -doppelt positive CD4 T Zellen mit Granzym-assoziiertem zytotoxischen Potential gezeigt (ZHOU et al., 2007). Bei den genannten Erregern ist der Verlust der zellulären Multifunktionalität unter anderem mit einer gesteigerten Expression inhibitorischer Rezeptoren vergesellschaftet. Nähere phänotypische Analysen bei Patienten mit BKV-assoziierten Komplikationen wurden dahingehend bislang noch nicht durchgeführt. Der Funktionalitätsverlust BKV-spezifischer T Zellen von Patienten mit Virus-assoziierten Komplikationen ließ sich in unseren Untersuchungen nur für diesen Zelltyp zeigen, denn die Funktionalität SEB-reaktiver T Zellen, welche Zelltypen anderweitiger Spezifitäten einschließen, war unverändert.

Es ist aktuell auch noch nicht geklärt, ob die funktionelle Beeinträchtigung der BKV-spezifischen T zellulären Immunantwort Ursache oder Folge einer gesteigerten viralen Replikation ist. Bei Patienten unter anhaltender CMV-Replikation kann man einen anergen T Zellphänotyp nachweisen, der gekennzeichnet ist durch eine eingeschränkte Funktionalität sowie die gesteigerte Expression des inhibitorischen Rezeptors PD-1 noch vor Auftreten einer messbaren Virämie (SESTER et al., 2008; DIRKS et al., 2013). Die T zelluläre Anergie kann in diesem Zusammenhang als ein Auslöser einer gesteigerten viralen Replikation betrachtet werden. Auch eine gewisse Zeit nach eingetretener Viruskontrolle findet man noch immer einen relevanten Anteil spezifischer T Zellen mit eingeschränkter Funktionalität (SESTER et al., 2008). Dieser Aspekt konnte auch für das BK Virus durch andere

---

Arbeitsgruppen bestätigt werden (TRYDZENSKAYA et al., 2011). Möglicherweise dient dabei die quantitative Zunahme spezifischer T Zellen in Patienten mit einer BKV-assoziierten Problematik der Kompensation ihrer eingeschränkten Funktionalität. In der Tat waren steigende Frequenzen BKV-spezifischer T Zellen als Antwort auf eine Reduktion des immunsuppressiven therapeutischen Regimes als einzige sinnvolle und effektive Behandlungsmethode BK viraler Komplikationen (HIRSCH, 2005; HIRSCH, RANDHAWA, 2009; HIRSCH et al., 2013) in vielen Fällen mit einer suffizienten Viruskontrolle assoziiert (BINGGELI et al., 2007; GINEVRI et al., 2007; COMOLI et al., 2008).

Eine mögliche Limitation dieser Arbeit ist ihr Querschnittsdesign. Deswegen lassen die erhobenen Daten keine Schlussfolgerungen hinsichtlich Veränderungen der T zellulären Funktionalität vor Auftreten einer manifesten Virämie zu. Der klinische Nutzen der zellulären Multifunktionalität in der zielgerichteten Steuerung therapeutischer Interventionen ist durch die Tatsache, dass BKV-spezifische T Zellen vor und in den ersten Wochen nach einer Transplantation generell nur niedrig messbar sind, deutlich erschwert. Aus diesem Grund sind BKV-spezifische T Zellen vermutlich weniger gut als beispielsweise die CMV-spezifische zelluläre Immunität (SESTER et al., 2008) zur Prädiktion Virus-assoziiierter Komplikationen geeignet.

Andersherum könnte man den Verlust der zellulären Funktionalität aufgrund des Anstiegs BKV-spezifischer T Zellen bei aktiver Virusreplikation und/oder nach Reduktion der immunsuppressiven Therapie als Korrelat einer unzureichenden Viruskontrolle betrachten. Dass ein großer Anteil polyfunktionaler Antigen-spezifischer T Zellen besonders bei Patienten nach rascher BKV-Elimination nachgewiesen werden konnte, unterstreicht diese These (TRYDZENSKAYA et al., 2011). Zytokinprofile ermöglichen somit das immunologische Monitoring von transplantierten Patienten in der Virämie, die damit dem Risiko der Entwicklung einer Polyomavirus-assoziierten Nephropathie ausgesetzt sind. Die klinische Bedeutung ergibt sich aus der direkten therapeutischen Konsequenz in Form einer Reduktion der Immunsuppression für alle Patienten mit nachgewiesener BKV-assoziiierter Problematik, auch wenn der Anteil an Patienten mit Progression zur Polyomavirus-assoziierten Nephropathie gering ist (HIRSCH, RANDHAWA, 2009, 2013). Die Immundiagnostik könnte somit zu einer besseren Identifizierung dieser

---

Risikopatienten beitragen. Gleichzeitig wäre durch die in wenigeren Fällen notwendige Herabsetzung der immunsuppressiven Medikation das allgemeine Risiko einer Transplantatabstoßung deutlich verringert.

Hinsichtlich ihrer technischen Gegebenheiten ist die durchflusszytometrische Analyse mittels Vollblutassay grundsätzlich für den Einsatz in der klinischen Routine geeignet. Nichtsdestotrotz sind im Bereich der Immundiagnostik der BKV-Infektion weitere longitudinale Studien notwendig um ihre Einsatzmöglichkeiten zu erweitern, insbesondere um Patienten mit direktem Therapieansprechen (rückläufige Virämie/Virurie) von denen mit verzögertem oder gar fehlendem Ansprechen zu differenzieren und damit diejenigen Patienten mit hohem Risiko für die Entwicklung einer Polyomavirus-assoziierten Nephropathie möglichst frühzeitig identifizieren zu können.

Zusammenfassend konnte diese Arbeit zeigen, dass die am höchsten messbaren Frequenzen BKV-spezifischer T Zellen in zeitlichem Zusammenhang mit einer BKV-Primärinfektion in jungen immunkompetenten Erwachsenen oder einer BKV-Reaktivierung in immunsupprimierten Nierentransplantatempfängern zu beobachten sind. Dabei sind ältere Transplantatempfänger aufgrund der mit steigendem Lebensalter abnehmenden zellulären Immunität einem erhöhten Risiko einer BKV-Reaktivierung und daraus möglicherweise resultierender Komplikationen ausgesetzt. Trotz quantitativer Gemeinsamkeiten unterscheiden sich die jungen Erwachsenen deutlich von den Transplantatempfängern nach BKV-Problematik hinsichtlich der Funktionalität ihrer BKV-spezifischen Immunantwort. Aus diesem Grund sind zelluläre Zytokinprofile ein möglicherweise vielversprechendes Instrument zur Unterscheidung einer immunologisch kontrollierten BKV-Infektion von einer unkontrollierten Virusreplikation und könnten somit der Risikoabschätzung einer Polyomavirus-assoziierten Nephropathie dienen.

---

## 6 Literaturverzeichnis

1. Ali AM, Gibson IW, Birk P, Blydt-Hansen TD (2011) Pretransplant serologic testing to identify the risk of polyoma BK viremia in pediatric kidney transplant recipients. *Pediatr Transplant* 15:827-834
2. Andrews CA, Shah KV, Daniel RW, Hirsch MS, Rubin RH (1988) A serological investigation of BK virus and JC virus infections in recipients of renal allografts. *J Infect Dis* 158:176-181
3. Apperley JF, Rice SJ, Bishop JA, Chia YC, Krausz T, Gardner SD, Goldman JM (1987) Late-onset hemorrhagic cystitis associated with urinary excretion of polyomaviruses after bone marrow transplantation. *Transplantation* 43:108-112
4. Babel N, Volk HD, Reinke P (2011) BK polyomavirus infection and nephropathy: the virus-immune system interplay. *Nat Rev Nephrol* 7:399-406
5. Binggeli S, Egli A, Schaub S, Binet I, Mayr M, Steiger J, Hirsch HH (2007) Polyomavirus BK-specific cellular immune response to VP1 and large T-antigen in kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 7:1131-1139
6. Bodaghi S, Comoli P, Bosch R, Azzi A, Gosert R, Leuenberger D, Ginevri F, Hirsch HH (2009) Antibody responses to recombinant polyomavirus BK large T and VP1 proteins in young kidney transplant patients. *J Clin Microbiol* 47:2577-2585
7. Bofill-Mas S, Formiga-Cruz M, Clemente-Casares P, Calafell F, Girones R (2001) Potential transmission of human polyomaviruses through the gastrointestinal tract after exposure to virions or viral DNA. *J Virol* 75:10290-10299
8. Bogdanovic G, Priftakis P, Taemmeraes B, Gustafsson A, Flaegstad T, Winiarski J, Dalianis T (1998) Primary BK virus (BKV) infection due to possible BKV transmission during bone marrow transplantation is not the major cause of hemorrhagic cystitis in transplanted children. *Pediatr Transplant* 2:288-293
9. Bohl DL, Brennan DC, Ryschkewitsch C, Gaudreault-Keener M, Major EO, Storch GA (2008) BK virus antibody titers and intensity of infections after renal transplantation. *J Clin Virol* 43:184-189
10. Bohl DL, Storch GA, Ryschkewitsch C, Gaudreault-Keener M, Schnitzler MA, Major EO, Brennan DC (2005) Donor origin of BK virus in renal transplantation and role of HLA C7 in susceptibility to sustained BK viremia. *Am J Transplant* 5:2213-2221
11. Boldorini R, Allegrini S, Miglio U, Paganotti A, Cocca N, Zaffaroni M, Riboni F, Monga G, Viscidi R (2011) Serological evidence of vertical transmission of JC and BK polyomaviruses in humans. *J Gen Virol* 92:1044-1050
12. Brennan DC, Agha I, Bohl DL, Schnitzler MA, Hardinger KL, Lockwood M, Torrence S, Schuessler R, Roby T, Gaudreault-Keener M, Storch GA (2005) Incidence of BK with tacrolimus versus cyclosporine and impact of preemptive immunosuppression reduction. *Am J Transplant* 5:582-594
13. Bressollette-Bodin C, Coste-Burel M, Hourmant M, Sebille V, Andre-Garnier E, Imbert-Marcille BM (2005) A prospective longitudinal study of BK virus infection in 104 renal transplant recipients. *Am J Transplant* 5:1926-1933
14. Buehrig CK, Lager DJ, Stegall MD, Kreps MA, Kremers WK, Gloor JM, Schwab TR, Velosa JA, Fidler ME, Larson TS, Griffin MD (2003) Influence of surveillance renal allograft biopsy on diagnosis and prognosis of polyomavirus-associated nephropathy. *Kidney Int* 64:665-673
15. Chang CY, Gangji A, Chorneyko K, Kapoor A (2005) Urological manifestations of BK polyomavirus in renal transplant recipients. *Can J Urol* 12:2829-2836
16. Chang D, Wang M, Ou WC, Lee MS, Ho HN, Tsai RT (1996) Genotypes of human polyomaviruses in urine samples of pregnant women in Taiwan. *J Med Virol* 48:95-101

- 
17. Chen Y, Trofe J, Gordon J, Autissier P, Woodle ES, Koralnik IJ (2008) BKV and JCV large T antigen-specific CD8+ T cell response in HLA A\*0201+ kidney transplant recipients with polyomavirus nephropathy and patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Clin Virol* 42:198-202
  18. Chesters PM, Heritage J, McCance DJ (1983) Persistence of DNA sequences of BK virus and JC virus in normal human tissues and in diseased tissues. *J Infect Dis* 147:676-684
  19. Comoli P, Azzi A, Maccario R, Basso S, Botti G, Basile G, Fontana I, Labirio M, Cometa A, Poli F, Perfumo F, Locatelli F, Ginevri F (2004) Polyomavirus BK-specific immunity after kidney transplantation. *Transplantation* 78:1229-1232
  20. Comoli P, Binggeli S, Ginevri F, Hirsch HH (2006) Polyomavirus-associated nephropathy: update on BK virus-specific immunity. *Transpl Infect Dis* 8:86-94
  21. Comoli P, Hirsch HH, Ginevri F (2008) Cellular immune responses to BK virus. *Curr Opin Organ Transplant* 13:569-574
  22. Crowder CD, Gyure KA, Drachenberg CB, Werner J, Morales RE, Hirsch HH, Ramos E (2005) Successful outcome of progressive multifocal leukoencephalopathy in a renal transplant patient. *Am J Transplant* 5:1151-1158
  23. Degener AM, Pietropaolo V, Di Taranto C, Rizzuti V, Ameglio F, Cordiali Fei P, Caprilli F, Capitanio B, Sinibaldi L, Orsi N (1997) Detection of JC and BK viral genome in specimens of HIV-1 infected subjects. *New Microbiol* 20:115-122
  24. Dharnidharka VR, Cherikh WS, Abbott KC (2009) An OPTN analysis of national registry data on treatment of BK virus allograft nephropathy in the United States. *Transplantation* 87:1019-1026
  25. Ding R, Suthanthiran M (2003) Noninvasive diagnosis of BK virus nephritis by measurement of messenger RNA for BK VP1 virus in urine. *Transplantation* 76:446
  26. Dirks J, Tas H, Schmidt T, Kirsch S, Gartner BC, Sester U, Sester M (2013) PD-1 analysis on CD28(-) CD27(-) CD4 T cells allows stimulation-independent assessment of CMV viremic episodes in transplant recipients. *Am J Transplant* 13:3132-3141
  27. Dolei A, Pietropaolo V, Gomes E, Di Taranto C, Ziccheddu M, Spanu MA, Lavorino C, Manca M, Degener AM (2000) Polyomavirus persistence in lymphocytes: prevalence in lymphocytes from blood donors and healthy personnel of a blood transfusion centre. *J Gen Virol* 81:1967-1973
  28. Dorries K (1998) Molecular biology and pathogenesis of human polyomavirus infections. *Dev Biol Stand* 94:71-79
  29. Drachenberg C, Hirsch HH, Papadimitriou JC, Mozafari P, Wali R, McKinney JD, Nogueira J, Cangro CB, Mendley S, Klassen DK, Ramos E (2004a) Cost efficiency in the prospective diagnosis and follow-up of polyomavirus allograft nephropathy. *Transplant Proc* 36:3028-3031
  30. Drachenberg CB, Beskow CO, Cangro CB, Bourquin PM, Simsir A, Fink J, Weir MR, Klassen DK, Bartlett ST, Papadimitriou JC (1999) Human polyoma virus in renal allograft biopsies: morphological findings and correlation with urine cytology. *Hum Pathol* 30:970-977
  31. Drachenberg CB, Hirsch HH, Papadimitriou JC, Gosert R, Wali RK, Munivenkatappa R, Nogueira J, Cangro CB, Haririan A, Mendley S, Ramos E (2007) Polyomavirus BK versus JC replication and nephropathy in renal transplant recipients: a prospective evaluation. *Transplantation* 84:323-330
  32. Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Hirsch HH, Wali R, Crowder C, Nogueira J, Cangro CB, Mendley S, Mian A, Ramos E (2004b) Histological patterns of polyomavirus nephropathy: correlation with graft outcome and viral load. *Am J Transplant* 4:2082-2092
  33. Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Wali R, Nogueira J, Mendley S, Hirsch HH, Cangro CB, Klassen DK, Weir MR, Bartlett ST, Ramos E (2004c) Improved outcome of polyoma virus allograft nephropathy with early biopsy. *Transplant Proc* 36:758-759

- 
34. Drachenberg RC, Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Ramos E, Fink JC, Wali R, Weir MR, Cangro CB, Klassen DK, Khaled A, Cunningham R, Bartlett ST (2001) Morphological spectrum of polyoma virus disease in renal allografts: diagnostic accuracy of urine cytology. *Am J Transplant* 1:373-381
  35. Dropulic LK, Jones RJ (2008) Polyomavirus BK infection in blood and marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 41:11-18
  36. Egli A, Infanti L, Dumoulin A, Buser A, Samaridis J, Stebler C, Gosert R, Hirsch HH (2009a) Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors. *J Infect Dis* 199:837-846
  37. Egli A, Kohli S, Dickenmann M, Hirsch HH (2009b) Inhibition of polyomavirus BK-specific T-Cell responses by immunosuppressive drugs. *Transplantation* 88:1161-1168
  38. Funk GA, Gosert R, Comoli P, Ginevri F, Hirsch HH (2008) Polyomavirus BK replication dynamics in vivo and in silico to predict cytopathology and viral clearance in kidney transplants. *Am J Transplant* 8:2368-2377
  39. Gardner SD, Field AM, Coleman DV, Hulme B (1971) New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet* 1:1253-1257
  40. Ginevri F, Azzi A, Hirsch HH, Basso S, Fontana I, Cioni M, Bodaghi S, Salotti V, Rinieri A, Botti G, Perfumo F, Locatelli F, Comoli P (2007) Prospective monitoring of polyomavirus BK replication and impact of pre-emptive intervention in pediatric kidney recipients. *Am J Transplant* 7:2727-2735
  41. Ginevri F, De Santis R, Comoli P, Pastorino N, Rossi C, Botti G, Fontana I, Nocera A, Cardillo M, Ciardi MR, Locatelli F, Maccario R, Perfumo F, Azzi A (2003) Polyomavirus BK infection in pediatric kidney-allograft recipients: a single-center analysis of incidence, risk factors, and novel therapeutic approaches. *Transplantation* 75:1266-1270
  42. Goddard AG, Saha V (1997) Late-onset hemorrhagic cystitis following bone marrow transplantation: a case report. *Pediatr Hematol Oncol* 14:273-275
  43. Gosert R, Rinaldo CH, Funk GA, Egli A, Ramos E, Drachenberg CB, Hirsch HH (2008) Polyomavirus BK with rearranged noncoding control region emerge in vivo in renal transplant patients and increase viral replication and cytopathology. *J Exp Med* 205:841-852
  44. Hariharan S, Cohen EP, Vasudev B, Orentas R, Viscidi RP, Kakela J, DuChateau B (2005) BK virus-specific antibodies and BKV DNA in renal transplant recipients with BKV nephritis. *Am J Transplant* 5:2719-2724
  45. Hirsch HH (2002) Polyomavirus BK nephropathy: a (re-)emerging complication in renal transplantation. *Am J Transplant* 2:25-30
  46. Hirsch HH (2005) BK virus: opportunity makes a pathogen. *Clin Infect Dis* 41:354-360
  47. Hirsch HH, Brennan DC, Drachenberg CB, Ginevri F, Gordon J, Limaye AP, Mihatsch MJ, Nickenleit V, Ramos E, Randhawa P, Shapiro R, Steiger J, Suthanthiran M, Trofe J (2005) Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analyses and recommendations. *Transplantation* 79:1277-1286
  48. Hirsch HH, Knowles W, Dickenmann M, Passweg J, Klimkait T, Mihatsch MJ, Steiger J (2002) Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients. *N Engl J Med* 347:488-496
  49. Hirsch HH, Randhawa P (2009) BK virus in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 9 Suppl 4:S136-146
  50. Hirsch HH, Randhawa P (2013) BK polyomavirus in solid organ transplantation. *Am J Transplant* 13 Suppl 4:179-188
  51. Hirsch HH, Steiger J (2003) Polyomavirus BK. *Lancet Infect Dis* 3:611-623

- 
52. Hirsch HH, Vincenti F, Friman S, Tuncer M, Citterio F, Wiecek A, Scheuermann EH, Klinger M, Russ G, Pescovitz MD, Prestele H (2013) Polyomavirus BK replication in de novo kidney transplant patients receiving tacrolimus or cyclosporine: a prospective, randomized, multicenter study. *Am J Transplant* 13:136-145
  53. Jeffers LK, Madden V, Webster-Cyriaque J (2009) BK virus has tropism for human salivary gland cells in vitro: implications for transmission. *Virology* 394:183-193
  54. Jin L, Gibson PE, Knowles WA, Clewley JP (1993) BK virus antigenic variants: sequence analysis within the capsid VP1 epitope. *J Med Virol* 39:50-56
  55. Kahan AV, Coleman DV, Koss LG (1980) Activation of human polyomavirus infection-detection by cytologic technics. *Am J Clin Pathol* 74:326-332
  56. Kannanganat S, Ibegbu C, Chennareddi L, Robinson HL, Amara RR (2007a) Multiple-cytokine-producing antiviral CD4 T cells are functionally superior to single-cytokine-producing cells. *J Virol* 81:8468-8476
  57. Kannanganat S, Kapogiannis BG, Ibegbu C, Chennareddi L, Goepfert P, Robinson HL, Lennox J, Amara RR (2007b) Human immunodeficiency virus type 1 controllers but not noncontrollers maintain CD4 T cells coexpressing three cytokines. *J Virol* 81:12071-12076
  58. Khan H, Oberoi S, Mahvash A, Sharma M, Rondon G, Alousi A, Shpall EJ, Kontoyiannis DP, Champlin RE, Ciurea SO (2011) Reversible ureteral obstruction due to polyomavirus infection after percutaneous nephrostomy catheter placement. *Biol Blood Marrow Transplant* 17:1551-1555
  59. Knowles WA, Pipkin P, Andrews N, Vyse A, Minor P, Brown DW, Miller E (2003) Population-based study of antibody to the human polyomaviruses BKV and JCV and the simian polyomavirus SV40. *J Med Virol* 71:115-123
  60. Leuenberger D, Andresen PA, Gosert R, Binggeli S, Strom EH, Bodaghi S, Rinaldo CH, Hirsch HH (2007) Human polyomavirus type 1 (BK virus) agnoprotein is abundantly expressed but immunologically ignored. *Clin Vaccine Immunol* 14:959-968
  61. Luo C, Bueno M, Kant J, Randhawa P (2008) Biologic diversity of polyomavirus BK genomic sequences: Implications for molecular diagnostic laboratories. *J Med Virol* 80:1850-1857
  62. Manitpitkul W, Drachenberg C, Ramos E, Munivenkatappa R, Philosophe B, Klassen D, Haririan A (2009) Maintenance immunosuppressive agents as risk factors for BK virus nephropathy: a case-control study. *Transplantation* 88:83-88
  63. Mathur VS, Olson JL, Darragh TM, Yen TS (1997) Polyomavirus-induced interstitial nephritis in two renal transplant recipients: case reports and review of the literature. *Am J Kidney Dis* 29:754-758
  64. Mes TH, van Doornum GJ, Schutten M (2010) Population genetic tests suggest that the epidemiologies of JCV and BKV are strikingly different. *Infect Genet Evol* 10:397-403
  65. Monini P, Rotola A, de Lellis L, Corallini A, Secchiero P, Albin A, Benelli R, Parravicini C, Barbanti-Brodano G, Cassai E (1996) Latent BK virus infection and Kaposi's sarcoma pathogenesis. *Int J Cancer* 66:717-722
  66. Nickeleit V, Hirsch HH, Binet IF, Gudat F, Prince O, Dalquen P, Thiel G, Mihatsch MJ (1999) Polyomavirus infection of renal allograft recipients: from latent infection to manifest disease. *J Am Soc Nephrol* 10:1080-1089
  67. Nickeleit V, Klimkait T, Binet IF, Dalquen P, Del Zenero V, Thiel G, Mihatsch MJ, Hirsch HH (2000) Testing for polyomavirus type BK DNA in plasma to identify renal-allograft recipients with viral nephropathy. *N Engl J Med* 342:1309-1315

- 
68. Pang XL, Doucette K, LeBlanc B, Cockfield SM, Preiksaitis JK (2007) Monitoring of polyomavirus BK virus viremia and viremia in renal allograft recipients by use of a quantitative real-time PCR assay: one-year prospective study. *J Clin Microbiol* 45:3568-3573
  69. Peterman TA, Jaffe HW, Beral V (1993) Epidemiologic clues to the etiology of Kaposi's sarcoma. *AIDS* 7:605-611
  70. Polo C, Perez JL, Mielnichuck A, Fedele CG, Niubo J, Tenorio A (2004) Prevalence and patterns of polyomavirus urinary excretion in immunocompetent adults and children. *Clin Microbiol Infect* 10:640-644
  71. Prince O, Savic S, Dickenmann M, Steiger J, Bubendorf L, Mihatsch MJ (2009) Risk factors for polyoma virus nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 24:1024-1033
  72. Purighalla R, Shapiro R, McCauley J, Randhawa P (1995) BK virus infection in a kidney allograft diagnosed by needle biopsy. *Am J Kidney Dis* 26:671-673
  73. Rajpoot DK, Gomez A, Tsang W, Shanberg A (2007) Ureteric and urethral stenosis: a complication of BK virus infection in a pediatric renal transplant patient. *Pediatr Transplant* 11:433-435
  74. Ramos E, Drachenberg CB, Portocarrero M, Wali R, Klassen DK, Fink JC, Farney A, Hirsch H, Papadimitriou JC, Cangro CB, Weir MR, Bartlett ST (2002) BK virus nephropathy diagnosis and treatment: experience at the University of Maryland Renal Transplant Program. *Clin Transpl*:143-153
  75. Randhawa P, Bohl D, Brennan D, Ruppert K, Ramaswami B, Storch G, March J, Shapiro R, Viscidi R (2008) longitudinal analysis of levels of immunoglobulins against BK virus capsid proteins in kidney transplant recipients. *Clin Vaccine Immunol* 15:1564-1571
  76. Randhawa P, Viscidi R, Carter JJ, Galloway DA, Culp TD, Huang C, Ramaswami B, Christensen ND (2009) Identification of species-specific and cross-reactive epitopes in human polyomavirus capsids using monoclonal antibodies. *J Gen Virol* 90:634-639
  77. Randhawa PS, Finkelstein S, Scantlebury V, Shapiro R, Vivas C, Jordan M, Picken MM, Demetris AJ (1999) Human polyoma virus-associated interstitial nephritis in the allograft kidney. *Transplantation* 67:103-109
  78. Randhawa PS, Gupta G, Vats A, Shapiro R, Viscidi RP (2006) Immunoglobulin G, A, and M responses to BK virus in renal transplantation. *Clin Vaccine Immunol* 13:1057-1063
  79. Randhawa PS, Khaleel-Ur-Rehman K, Swalsky PA, Vats A, Scantlebury V, Shapiro R, Finkelstein S (2002) DNA sequencing of viral capsid protein VP-1 region in patients with BK virus interstitial nephritis. *Transplantation* 73:1090-1094
  80. Reploeg MD, Storch GA, Clifford DB (2001) Bk virus: a clinical review. *Clin Infect Dis* 33:191-202
  81. Sadaoka K, Okamoto S, Gomi Y, Tanimoto T, Ishikawa T, Yoshikawa T, Asano Y, Yamanishi K, Mori Y (2008) Measurement of varicella-zoster virus (VZV)-specific cell-mediated immunity: comparison between VZV skin test and interferon-gamma enzyme-linked immunospot assay. *J Infect Dis* 198:1327-1333
  82. Schachtner T, Muller K, Stein M, Diezemann C, Sefrin A, Babel N, Reinke P (2011) BK virus-specific immunity kinetics: a predictor of recovery from polyomavirus BK-associated nephropathy. *Am J Transplant* 11:2443-2452
  83. Schachtner T, Stein M, Sefrin A, Babel N, Reinke P (2013) Inflammatory activation and recovering BKV-specific immunity correlate with self-limited BKV replication after renal transplantation. *Transpl Int*
  84. Schmidt T, Dirks J, Enders M, Gartner BC, Uhlmann-Schiffler H, Sester U, Sester M (2012) CD4+ T-cell immunity after pandemic influenza vaccination cross-reacts with seasonal antigens and functionally differs from active influenza infection. *Eur J Immunol* 42:1755-1766

- 
85. Schold JD, Rehman S, Kayle LK, Magliocca J, Srinivas TR, Meier-Kriesche HU (2009) Treatment for BK virus: incidence, risk factors and outcomes for kidney transplant recipients in the United States. *Transpl Int* 22:626-634
  86. Schub D, Janssen E, Leyking S, Sester U, Assmann G, Hennes P, Smola S, Vogt T, Rohrer T, Sester M, Schmidt T (2014) Altered Phenotype and Functionality of Varicella Zoster Virus-Specific Cellular Immunity in Individuals With Active Infection. *J Infect Dis*
  87. Seder RA, Darrah PA, Roederer M (2008) T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol* 8:247-258
  88. Semmo N, Day CL, Ward SM, Lucas M, Harcourt G, Loughry A, Klenerman P (2005) Preferential loss of IL-2-secreting CD4+ T helper cells in chronic HCV infection. *Hepatology* 41:1019-1028
  89. Sester U, Fousse M, Dirks J, Mack U, Prasse A, Singh M, Lalvani A, Sester M (2011) Whole-blood flow-cytometric analysis of antigen-specific CD4 T-cell cytokine profiles distinguishes active tuberculosis from non-active states. *PLoS One* 6:e17813
  90. Sester U, Presser D, Dirks J, Gartner BC, Kohler H, Sester M (2008) PD-1 expression and IL-2 loss of cytomegalovirus-specific T cells correlates with viremia and reversible functional anergy. *Am J Transplant* 8:1486-1497
  91. Shah KV, Daniel RW, Warszawski RM (1973) High prevalence of antibodies to BK virus, an SV40-related papovavirus, in residents of Maryland. *J Infect Dis* 128:784-787
  92. Sharp CP, Norja P, Anthony I, Bell JE, Simmonds P (2009) Reactivation and mutation of newly discovered WU, KI, and Merkel cell carcinoma polyomaviruses in immunosuppressed individuals. *J Infect Dis* 199:398-404
  93. Shinohara T, Matsuda M, Cheng SH, Marshall J, Fujita M, Nagashima K (1993) BK virus infection of the human urinary tract. *J Med Virol* 41:301-305
  94. Smith JM, McDonald RA, Finn LS, Healey PJ, Davis CL, Limaye AP (2004) Polyomavirus nephropathy in pediatric kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 4:2109-2117
  95. Testi R, Phillips JH, Lanier LL (1989) T cell activation via Leu-23 (CD69). *J Immunol* 143:1123-1128
  96. Trydzenskaya H, Sattler A, Muller K, Schachtner T, Dang-Heine C, Friedrich P, Nickel P, Hoerstrup J, Schindler R, Thiel A, Melzig MF, Reinke P, Babel N (2011) Novel approach for improved assessment of phenotypic and functional characteristics of BKV-specific T-cell immunity. *Transplantation* 92:1269-1277
  97. van der Meijden E, Janssens RW, Lauber C, Bouwes Bavinck JN, Gorbalenya AE, Feltkamp MC (2010) Discovery of a new human polyomavirus associated with trichodysplasia spinulosa in an immunocompromized patient. *PLoS Pathog* 6:e1001024
  98. Vasudev B, Hariharan S, Hussain SA, Zhu YR, Bresnahan BA, Cohen EP (2005) BK virus nephritis: risk factors, timing, and outcome in renal transplant recipients. *Kidney Int* 68:1834-1839
  99. Viscount HB, Eid AJ, Espy MJ, Griffin MD, Thomsen KM, Harmsen WS, Razonable RR, Smith TF (2007) Polyomavirus polymerase chain reaction as a surrogate marker of polyomavirus-associated nephropathy. *Transplantation* 84:340-345
  100. Vogeli TA, Peinemann F, Burdach S, Ackermann R (1999) Urological treatment and clinical course of BK polyomavirus-associated hemorrhagic cystitis in children after bone marrow transplantation. *Eur Urol* 36:252-257
  101. Wadei HM, Rule AD, Lewin M, Mahale AS, Khamash HA, Schwab TR, Gloor JM, Textor SC, Fidler ME, Lager DJ, Larson TS, Stegall MD, Cosio FG, Griffin MD (2006) Kidney transplant function and histological clearance of virus following diagnosis of polyomavirus-associated nephropathy (PVAN). *Am J Transplant* 6:1025-1032

- 
102. Weinberg A, Lazar AA, Zerbe GO, Hayward AR, Chan IS, Vessey R, Silber JL, MacGregor RR, Chan K, Gershon AA, Levin MJ (2010) Influence of age and nature of primary infection on varicella-zoster virus-specific cell-mediated immune responses. *J Infect Dis* 201:1024-1030
  103. Weinreb DB, Desman GT, Amolat-Apiado MJ, Burstein DE, Godbold JH, Jr., Johnson EM (2006) Polyoma virus infection is a prominent risk factor for bladder carcinoma in immunocompetent individuals. *Diagn Cytopathol* 34:201-203
  104. Yeo FE, Yuan CM, Swanson SJ, Reinmuth B, Kiandoli LC, Kaplan KJ, Abbott KC, Reynolds JC (2008) The prevalence of BK polyomavirus infection in outpatient kidney transplant recipients followed in a single center. *Clin Transplant* 22:532-541
  105. Yogo Y, Sugimoto C, Zhong S, Homma Y (2009) Evolution of the BK polyomavirus: epidemiological, anthropological and clinical implications. *Rev Med Virol* 19:185-199
  106. Zhong S, Zheng HY, Suzuki M, Chen Q, Ikegaya H, Aoki N, Usuku S, Kobayashi N, Nukuzuma S, Yasuda Y, Kuniyoshi N, Yogo Y, Kitamura T (2007) Age-related urinary excretion of BK polyomavirus by nonimmunocompromised individuals. *J Clin Microbiol* 45:193-198
  107. Zhou W, Sharma M, Martinez J, Srivastava T, Diamond DJ, Knowles W, Lacey SF (2007) Functional characterization of BK virus-specific CD4+ T cells with cytotoxic potential in seropositive adults. *Viral Immunol* 20:379-388
  108. Modrow S, Falke D, Truyen U, Schätzl H (3. Auflage 2010) *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg
  109. Murphy K, Travers P, Walport M (7. Auflage 2009) *Janeway Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg

---

## 7 Publikationen

### 7.1 Manuskript

- 1 Schmidt, T., **Adam, C.**, Hirsch, H. H., Janssen, M. W. W., Wolf, M., Dirks, J., Kardas, P., Ahlenstiel-Grunow, T., Pape, L., Fliser, D., Sester, M., Sester, U.  
*“BK virus-specific cellular immune responses are age-dependent and strongly correlate with phases of virus replication”*  
Am J Transplant 2014; 14:1334-1345. *Impact Punkte: 6.192*

### 7.2 Kongressbeiträge

- 1 **Kislat, C.**, Schmidt, T., Janssen, M. W. W., Wolf, M., Dirks, J., Ahlenstiel, T., Pape, L., Fliser, D., Sester, M., Sester, U.  
*“BK virus-specific cellular immune responses are age-dependent and strongly correlate with phases of virus replication”*  
Vortrag auf der 48. Jahrestagung der ERA-EDTA, Prag 2011
- 2 Schmidt, T., **Kislat, C.**, Janssen, M. W. W., Wolf, M., Dirks, J., Ahlenstiel, T., Pape, L., Fliser, D., Sester, M., Sester, U.  
*“BK virus-specific cellular immune responses are age-dependent and strongly correlate with phases of virus replication”*  
Posterbeitrag auf dem American Transplant Congress, Philadelphia 2011
- 3 **Adam, C.**, Schmidt, T., Hirsch, H. H., Janssen, M. W. W., Wolf, M., Dirks, J., Ahlenstiel, T., Pape, L., Fliser, D., Sester, M., Sester, U.  
*“BK virus-specific cellular immune responses are age-dependent and strongly correlate with phases of virus replication”*  
Vortrag auf dem 24. International Congress of The Transplantation Society, Berlin 2012
- 4 **Adam, C.**, Schmidt, T., Hirsch, H. H., Janssen, M. W. W., Wolf, M., Dirks, J., Ahlenstiel, T., Pape, L., Fliser, D., Sester, M., Sester, U.  
*“Clinical relevant BKV-replication events in renal transplant recipients are associated with significant changes in T-cell functionality”*

---

Vortrag auf der 22. Jahrestagung der Deutschen  
Transplantationsgesellschaft, Frankfurt am Main 2013

### **7.3 Auszeichnung**

**President´s Choice Award** für C. Adam

verliehen für die 10 besten Beiträge der gesamten Konferenz

Für Beitrag und Vortrag auf dem 24. International Congress of The Transplantation Society, Berlin 2012

---

## 8 Danksagung

Zu allererst möchte ich Frau Prof. Dr. rer. nat. Martina Sester dafür danken, dass sie mir die Möglichkeit gab in ihrem Institut und ihrer tollen Arbeitsgruppe meine Doktorarbeit anzufertigen. Ohne ihre Motivation und Hilfe hätte ich es nicht geschafft. Auch für die stetige Motivation und die zahlreichen fachlichen und technischen Hilfestellungen möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Mein weiterer sehr großer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Tina Schmidt für die Betreuung der Arbeit, ihre Geduld, die Hilfestellungen und Tipps und vor allem die mentale Unterstützung, das Ziel, trotz aller Umstände, nicht aus den Augen zu verlieren.

Auch Herrn Dipl. Biol. David Schub danke ich dahingehend für die fachliche Unterstützung, die dringend nötig war um das Ganze in dieser Form zum Abschluss zu bringen.

Ich bedanke mich bei Herrn PD Dr. med. Urban Sester dafür, dass er mir überhaupt in die "AG Sester" geführt hat. Des Weiteren bin ich ihm sehr dankbar für die pausenlose Motivation und sein statistisches Know How, vor dem ich ewig Respekt haben werde.

Ich danke allen Mitgliedern der AG Sester, namentlich dabei besonders hervorzuheben Frau Candida Guckelmus, Herr Dipl. Biol. Jan Dirks, Frau Katharina Schmitt und Frau Dipl. Biol. Michaela Wolf, für die Unterstützung bei Bereitstellung und Aufarbeitung der Proben sowie das stets offene Ohr bei Fragen und Problemen die technische Auswertung betreffend.

Auch den Kollegen, die mir bei der Probenentnahme geholfen haben und natürlich den zahlreichen Patienten und Probanden, die ihre Blutproben dieser Studie freiwillig zur Verfügung stellten, möchten ich ganz herzlich danken.

Ein besonderer Dank gilt auch meinem Mann Oliver für seine Unterstützung und den nicht enden wollenden Ansporn, die Arbeit zum Ende zu bringen.

Ohne meine Eltern wäre ich nicht dort wo ich heute bin und hätte diese Arbeit niemals schreiben können, denn sie haben mich damals ermutigt für das Medizinstudium in das Saarland zu ziehen. Dafür bin ich ihnen heute unendlich dankbar.

Zum Abschluss danke ich meinen zwei „kleinen Männern“ - Florian und Niklas - dafür, dass es sie gibt. Ihr beiden seid das Beste, das mir passieren konnte!

---

## 9 Lebenslauf

---

## 10 Eidesstattliche Erklärung

### Erklärung gemäß § 7 Abs. 1 Nr. 4

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater/innen oder anderer Personen) in Anspruch genommen.

Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Vor Aufnahme der vorstehenden Versicherung an Eides Statt wurde ich über die Bedeutung einer eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung belehrt.

Ort, Datum

Unterschrift der/des Promovierenden

Unterschrift der die Versicherung an Eides statt aufnehmenden Beamtin bzw. des aufnehmenden Beamten

---

## 11 Abkürzungsverzeichnis, alphabetisch

Anregungs-WL	Anregungswellenlänge
ANOVA	analysis of variance, Varianzanalyse
anti-BKV-IgG-Titer	BKV-spezifischer IgG-Antikörpertiter
anti-BKV-IgM-Titer	BKV-spezifischer IgM-Antikörpertiter
APC	Allophycocyanin
APZ	antigenpräsentierende Zelle(n)
BFA	Brefeldin A
BKV	BK Virus, B.K.=Initialen des ersten Patienten mit nachgewiesener BKV-Infektion
BKVN	BKV-assozierte Nephropathie
BSA	bovines Serumalbumin
BZR	B Zellrezeptor
°C	Grad Celcius
CD	Cluster of differentiation
CFDA-SE	Carboxy-Fluorescein-diacetat-Succinimidyl-Ester
CFSE	Carboxy-Fluorescein-Succinimidyl-Ester
CMV	Cytomegalievirus
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
DL	detection limit, Nachweisgrenze der positiven BKV-spezifischen zellulären Immunantwort
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure(n)EBV
EBV	Epstein Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
Elispot	enzyme linked immunospot assay(s)

---

ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	forward scatter, Vorwärtsstreulicht
g	g-Zahl, Gravitationsbeschleunigung auf der Erdoberfläche
Gln	Glutamin
HD	Hämodialysepatienten
HSA	humanes Serumalbumin
IFN $\gamma$	Interferon- $\gamma$
Ig	Immunglobulin
IL-2	Interleukin-2
JC Virus	J.C.=Initialen des ersten Patienten mit im Jahr 1971 nachgewiesener JC Virus-Infektion
kD	Kilodalton
KI Virus	nach dem Karolinska Institute (Solna, Schweden), wo es zuerst isoliert werden konnte, benanntes Polyomavirus
Ko	gesunde Kontrollpersonen
Kontrollen	gesunde Kontrollpersonen, Subkollektiv aus gesunden Kontrollen
$\mu$ g	Mikrogramm
MHC-I-(Molekül)	Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse I-Molekül
MHC-II-(Molekül)	Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II-Molekül
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ M	Mikromol
ml	Milliliter
mM	Millimol

---

mRNA	messenger Ribonukleinsäure
mTor-Inhibitor	mammalian Target of Rapamycin-Inhibitor
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
n.b.	nicht bestimmbar
NCCR	nicht-kodierende Kontrollregion
NK Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
OD <sub>492</sub>	die bei einer Wellenlänge von 492nm gemessene optische Dichte eines untersuchten Materials
p	Signifikanzniveau
PBMC(s)	peripheral blood mononuclear cell(s)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion(s-Diagnostik)
PE	Phycoerythrin
PE-Cy7	Phycoerythrin Cyanin 7
PerCP	Peridinin Chlorophyll Proteinkomplex
PFA	Paraformaldehyd
P/S	Penicillin-Streptomycin
PV	Polyomavirus/-viren
PVHZ	Polyomavirus-assozierte hämorrhagische Zystitis
PVN	Polyomavirus-assozierte Nephropathie
RPMI-Medium	“Roswell Park Memorial Institute”-Medium
RT	Raumtemperatur
RTX	Nierentransplantatempfänger
RTX-BKVneg	Nierentransplantatempfänger ohne nachgewiesene BKV-Reaktivierung

---

RTX-BKVpos	Nierentransplantatempfänger mit nachgewiesener BKV-Reaktivierung
SEB	Staphylococcus aureus Enterotoxin B
sog.	sogenannt(e,er,es)
SSC	side scatter
SV40	Simian Virus 40
T <sub>H1</sub> Zellen	T Helferzellen 1
T <sub>H2</sub> Zellen	T Helferzellen 2
T <sub>H17</sub> Zellen	T Helferzellen 17
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
T <sub>reg</sub>	regulatorische T Zellen
Tx	Transplantation
TZR	T Zellrezeptor
VLP	virus like particles, Virus-ähnliche Partikel
VP	Virusprotein
WU Virus	nach der Washington Universität (Washington, USA), wo es erstmals isoliert werden konnte, benanntes Polyomavirus