

Aus dem Charité Centrum 13
Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie und Internistische Intensivmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Charakterisierung der Polyomavirus BK-spezifischen Immunantwort nach Nierentransplantation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Thomas Schachtner

aus Erding

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. P. Reinke
2. Prof. Dr. med. B. Banas
3. Prof. Dr. med. H. Haller

Datum der Promotion: 07.09.2012

Meinen Eltern

1. Inhaltsverzeichnis

1. Inhaltsverzeichnis	4
2. Zusammenfassung	5
2.1 Abstract	5
2.2 Einleitung und Zielstellung	6
2.3 Patienten und Methodik	7
2.4 Ergebnisse	10
2.5 Diskussion	12
2.6 Literatur	15
3. Anteilserklärung	17
4. Ausgewählte Publikationen	19
4.1 Publikation 1: <i>BKV-specific immunity kinetics: a predictor of recovery from polyoma- virus BK-associated nephropathy</i>	19
4.2 Publikation 2: <i>BK-VP3 as a new target of cellular immunity in BK virus infection</i>	30
4.3 Publikation 3: <i>Novel approach for improved assessment of phenotypic and functional characteristics of BKV-specific T-cell immunity</i>	39
5. Lebenslauf	49
6. Komplette Publikationsliste	49
7. Selbständigkeitserklärung	54
8. Danksagung	55

2. Zusammenfassung

2.1 Abstract

Die BKV-assoziierte Nephropathie gehört zu den größten infektiösen Herausforderungen nach Nierentransplantation und steht im Zusammenhang mit dem Gebrauch neuer Immunsuppressiva und einer eingeschränkten BKV-spezifischen Immunität. Der frühen Diagnosestellung der BKV-Reaktivierung und der Identifizierung von Patienten mit erhöhtem Risiko für eine BKV-assoziierte Nephropathie kommt dabei die wichtigste Aufgabe zu. Profil und Kinetik der BKV-spezifischen Immunantwort sowie das diagnostische und prognostische Potential immunologischer Parameter bleiben dabei jedoch weiter ungeklärt.

In den vorliegenden Arbeiten wurde die BKV-spezifische Immunität von nierentransplantierten Patienten mit transienter BKV-Reaktivierung und BKV-assoziiierter Nephropathie untersucht. Die Frequenzen BKV-spezifischer T-Zellen wurden nach Stimulation mit 5 BKV-spezifischen Proteinen in einem Interferon- γ detektierenden Elispot assay bestimmt. Die Phänotypisierung Interferon- γ -, Interleukin-2- und Tumornekrosefaktor- α -produzierender BKV-spezifischer T-Zellen erfolgte durch eine 10-Farben-Durchflusszytometrie. BKV-spezifische Antikörper wurden mit der ELISA-Methode gemessen.

Von der Diagnose bis zum Ende der BKV-Reaktivierung zeigte sich ein signifikanter Anstieg BKV-spezifischer T-Zellen für alle BKV-spezifischen Proteine ($p < 0,001$). Patienten mit transienter BKV-Reaktivierung entwickelten ohne therapeutische Intervention erhöhte Frequenzen BKV-spezifischer T-Zellen. Im Gegensatz dazu war bei Patienten mit BKV-assoziiierter Nephropathie ein Anstieg BKV-spezifischer T-Zellen erst nach therapeutischer Intervention nachweisbar. Gegen Strukturproteine gerichtete T-Zellen waren dabei früher nachweisbar als gegen regulatorische Proteine gerichtete T-Zellen. Patienten nach transienter BKV-Reaktivierung hatten signifikant höhere Frequenzen multifunktionaler Interferon- γ /Interleukin-2/Tumornekrosefaktor- α -produzierender CD4⁺ T-Zellen ($p = 0,048$) als Patienten nach BKV-assoziiierter Nephropathie. Diese zeigten den größten Anstieg BKV-spezifischer IgG-Antikörper und eine Persistenz erhöhter IgM-Antikörper.

Das Monitoring der BKV-spezifischen Immunantwort kann bei Patienten mit aktiver BKV-Reaktivierung genutzt werden, um solche mit einem erhöhten Risiko für eine BKV-assoziierte Nephropathie zu identifizieren. Zudem kann der Nachweis BKV-spezifischer T-Zellen bei Patienten mit BKV-assoziiierter Nephropathie als Marker für den Therapieerfolg und damit als Maß für die erforderliche Reduktion der Immunsuppression dienen.

2.2 Einleitung und Zielstellung

Mit einer Prävalenz von 1-5 % und einem Transplantatverlust bei bis zu 30 % der Patienten stellt die BKV-assoziierte Nephropathie eine der größten Herausforderungen nach Nierentransplantation dar.¹⁻³ BKV ist ein unbehülltes, doppelsträngiges DNA-Virus, dessen Genom für die 3 Kapsidproteine VP1-3 und die 2 Regulationsproteine small t- und Large T-Antigen kodiert.⁴ Das Virus verbleibt nach Primärinfektion latent in Niere und ableitenden Harnwegen und kann bei eingeschränkter Immunkompetenz reaktivieren und zu einer BKV-assoziierten Nephropathie fortschreiten.^{4,5} Da die Ursache der BKV-assoziierten Nephropathie in einer nicht ausreichenden immunologischen Kontrolle der BKV-Reaktivierung gesehen wird und es keine wirksame antivirale Therapie gibt, stellt die Reduktion der Immunsuppression die einzige Behandlungsoption dar.⁶⁻⁸ Dem Screening durch quantitative Bestimmung der Viruslast in Urin und Serum kommt dabei die entscheidende Bedeutung zu, Patienten mit erhöhtem Risiko für die Entwicklung einer BKV-assoziierten Nephropathie frühzeitig zu identifizieren. Immunologische Parameter zur Risiko- oder Prognoseabschätzung stehen derzeit jedoch nicht zur Verfügung.⁹⁻¹¹ Erste Studien lassen jedoch einen Zusammenhang zwischen der Entwicklung einer BKV-spezifischen T-Zellantwort und der Kontrolle der BKV-Reaktivierung vermuten.¹²⁻¹⁶

Die gemeinsame wissenschaftliche Zielstellung der vorliegenden Arbeiten war die Etablierung und Optimierung von Methoden zur Charakterisierung der BKV-spezifischen Immunität, durch die zum ersten Mal folgende Fragestellungen formuliert werden konnten: (1) Welche unterschiedliche Bedeutung kommt den 5 BKV-spezifischen Proteinen in der Kontrolle der BKV-Reaktivierung zu? (2) Welche unterschiedliche Bedeutung kommt den verschiedenen phänotypischen und funktionellen Subtypen BKV-spezifischer T-Zellen in der Kontrolle der BKV-Reaktivierung zu? (3) Wie stellt sich die Kinetik der BKV-spezifischen zellulären und humoralen Immunantwort im Verlauf einer transienten BKV-Reaktivierung und einer bioptisch gesicherten BKV-assoziierten Nephropathie dar?

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Studien war es durch die erworbenen wissenschaftlichen Erkenntnisse erstmals zwei klinisch relevante Fragestellungen zu adressieren: (1) Kann das Monitoring der BKV-spezifischen Immunantwort zur Unterscheidung zwischen transienter BKV-Reaktivierung und BKV-assoziiierter Nephropathie genutzt werden und gibt es dabei einen zeitlichen Vorteil zur Bestimmung der Viruslast im Serum? (2) Kann das Monitoring der BKV-spezifischen Immunantwort bei Patienten mit BKV-assoziiierter Nephropathie als Parameter herangezogen werden, um Maß und Erfolg der Reduktion des immunsuppressiven Therapieregimes zu beurteilen?

2.3 Patienten und Methodik

2.3.1 Patienten

Die Studien wurden von der Ethikkommission der Charité - Universitätsmedizin Berlin geprüft und zugelassen. Die Einteilung der Gruppen erfolgte im Hinblick auf die formulierten wissenschaftlichen und klinischen Fragestellungen nach dem Schweregrad der BKV-Reaktivierung und dem Nachweis einer BKV-assoziierten Nephropathie. In den zwei Querschnittstudien nach BKV-Reaktivierung wurden 48 bzw. 39 Patienten eingeschlossen. In den Gruppen 1 wurden 19 bzw. 11 Patienten mit Zustand nach BKV-assoziiierter Nephropathie, in den Gruppen 2 wurden 16 Patienten mit Zustand nach transienter BKV-Reaktivierung untersucht. Als Kontrollgruppen dienten 13 bzw. 12 Patienten ohne BKV-Reaktivierung. In der Longitudinalstudie wurden 7 Patienten mit BKV-assoziiierter Nephropathie in Gruppe 1 und 11 Patienten mit transienter BKV-Reaktivierung in Gruppe 2 untersucht. Alle 7 Patienten mit BKV-assoziiierter Nephropathie wurden durch einen Wechsel der Immunsuppression von Tacrolimus auf Ciclosporin bzw. vom Mycophenolat-Derivat auf Azathioprin behandelt. 4 Patienten erhielten zusätzlich eine antivirale Therapie mit Cidofovir. Das Screening der BKV-Viruslast im Serum erfolgte bei allen Patienten monatlich in den ersten 6 Monaten nach Nierentransplantation, danach dreimonatlich und monatlich bei BKV-Reaktivierung. Zwischen den Gruppen gab es keinen Unterschied hinsichtlich Patientenalter, Transplantatalter und Immunsuppression ($p > 0,05$).

2.3.2 Quantitative Real-Time PCR zur Bestimmung der BKV-Viruslast im Serum

Die Isolierung der vorhandenen BKV-DNA erfolgte aus 200 µl Serum mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kits nach Anleitung des Herstellers. Der PCR-Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 25 µl setzte sich aus folgenden Reagenzien zusammen: 6 µl BKV-VP1 Primer Mix, 1 µl BKV-VP1 FAM-Sonde, 1 µl steriles deionisiertes Wasser, 12,5 µl TaqMan Master Mix, 4,5 µl der isolierten BKV-DNA. Primer und Sonden wurden so konstruiert, dass sie das BKV-spezifische Protein VP1 amplifizieren. Das Thermozyklerprogramm zur Durchführung der TaqMan-PCR fand in folgenden Schritten statt: (1) initiale Aktivierung der Taq DNA-Polymerase bei 95 °C für 10 min, (2) 40 Zyklen bestehend aus Denaturierung bei 95 °C für 15 s und Reannealing/Extension bei 60 °C für 1 min. Als Negativkontrolle wurde BKV-negatives AB-Serum, als Positivkontrolle ein BKV-Virusplasmid verwendet. Die Nachweisgrenze stellt die niedrigste in linearem Bereich gemessene BKV-Viruslast von 4500 DNA-Kopien/ml dar.

2.3.3 ELISA zur quantitativen Bestimmung BKV-spezifischer Antikörper

Die 96-Loch-Mikrotiterplatte wurde mit einem Viruspartikel der BKV-spezifischen VP1-Region beschichtet. Dabei wurden je 100 µl einer Viruspartikel-Lösung (1 µg/ml) hinzugegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach Inkubation mit der Blocking-Lösung wurden je 100 µl der verdünnten Serumproben (1:200 für IgM, 1:500 für IgG) hinzugegeben und für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen wurden je 100 µl eines mit Meerrettichperoxidase konjugierten sekundären Antikörpers gegen IgM bzw. IgG hinzugegeben und für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiterem fünfmaligem Waschen wurde mit 100 µL Meerrettichperoxidase-Substratlösung für 20 min im Dunkeln inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von je 100 µl 1 molarer Schwefelsäure beendet. Die optische Dichte wurde bei 405 nm im ELISA-Reader gemessen. Neben der Standardreihe wurden Positiv- und Negativkontrollen bei jeder Messung durchgeführt.

2.3.4 Elispot assay zum Nachweis Interferon-γ produzierender BKV-spezifischer T-Zellen

Die Isolation peripherer mononukleärer Zellen erfolgte aus 10 ml heparinisiertem Vollblut über Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll-Hypaque. In die Millipore Multiscreen 96-Loch-Platte wurden je 100 µl einer primären Anti-Interferon-γ-Antikörper-Lösung (3 µg/ml) hinzugegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden je 100 µl der peripheren mononukleären Zellen ($2,5 \times 10^6$ Zellen/ml) und je 100 µl des jeweiligen BKV-Peptids (1 µg/ml) hinzugegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Zur Stimulation dienten überlappende Peptidpools der BKV-spezifischen Proteine VP1-3, small t-Antigen und Large T-Antigen. Jede Patientenprobe wurde in Triplets getestet. Neben der unstimulierten Kontrolle dienten Staphylococcus Enterotoxin B (SEB, 1 µg/ml) als Positivkontrolle und Medium allein als Negativkontrolle. Nach dreimaligem Waschen wurden je 100 µl der sekundären Anti-Interferon-γ-Antikörper-Lösung (1 µg/ml) hinzugegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach viermaligem Waschen wurden je 100 µl Streptavidin (1 µg/ml) hinzugegeben und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Farbentwicklung der Spots wurden je 200 µl einer Visualisierungslösung bestehend aus Essigsäure/Acetat-Puffer, Essigsäure/Acetat-Substrat und 30 %iger H₂O₂-Lösung hinzugegeben. Die Platte wurde nach 3-5 min mit Wasser gespült und an der Luft getrocknet. Die Auswertung erfolgte mithilfe des AID Elispot Readers. Nach Subtraktion der unstimulierten Kontrolle von der stimulierten Probe erhielt man die Anzahl BKV-spezifischer T-Zellen. Für die Bewertung einer T-Zell-Antwort als positiv wurde ein Grenzwert von 10 Spots pro Ansatz festgelegt.

2.3.5 Durchflusszytometrie zum Nachweis multifunktionaler BKV-spezifischer T-Zellen

Die Isolation peripherer mononukleärer Zellen erfolgte aus 50 ml heparinisiertem Vollblut über Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll-Hypaque. 1 ml Zellsuspension zu je 5×10^6 Zellen/ml wurden mit 1 μg der überlappenden Peptidpools der BKV-spezifischen Proteine VP1-3, small t-Antigen und Large T-Antigen oder einem BKV-Gesamtpeptidmix, bestehend aus je 1 μg aller 5 BKV-Proteine, und 1 $\mu\text{g/ml}$ CD28-spezifischer Antikörper für 6 h im Inkubator bei 37 °C, gesättigter Luftfeuchtigkeit und 5 % CO_2 stimuliert. Staphylococcus Enterotoxin B (SEB, 1 $\mu\text{g/ml}$) diene als Positivkontrolle und Dimethylsulfoxid (DMSO) als Negativkontrolle. Nach 2 h wurden jedem Stimulationsansatz 2 $\mu\text{g/ml}$ Brefeldin A für die intrazelluläre Zytokinfärbung hinzugefügt. Fixierung und Permeabilisierung der Zellen erfolgte mit Hilfe eines Fixierung/Permeabilisierung Kits nach Anleitung des Herstellers. Zur Färbung wurden folgende Antikörper eingesetzt: CD3-PerCP/CD3-APC-Cy7, CD4-PacificOrange/CD4-ECD, CD8-PacificBlue/CD8-PeCy7, CD69-FIT, IL-2-PE, IFN- γ -Pe-Cy7/IFN- γ -eFluor450, TNF- α -AlexaFluor700, CD154-APC und IL-17A-PerCPCy5.5. Die Färbung auf tote Zellen erfolgte mit dem Live/Dead Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit nach Anleitung des Herstellers. Die Proben wurden im FACS LSRII-Durchflusszytometer gemessen und mit der FlowJo Software Version 6.4.7 ausgewertet. Nach Subtraktion der unstimulierten Kontrolle von der mit BKV-Peptid stimulierten Probe erhielt man die Anzahl der BKV-spezifischen T-Zellen. Für die Bewertung einer T-Zell-Antwort als positiv wurde ein Grenzwert von 0,001 % zytokinproduzierender CD4+/CD8+ T-Zellen festgelegt.

2.3.6 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit der SPSS Software Version 16. Für die univariate Analyse von Risikofaktoren der BKV-Reaktivierung wurde der Chi-Quadrat-Test bzw. Fisher-Yates-Test verwendet. Für die Auswertung nicht normalverteilter, unabhängiger Parameter diene der Kruskal-Wallis Test und der Mann-Whitney U-Test. Für die Auswertung nicht normalverteilter, abhängiger Parameter diene der Friedman Test und der Wilcoxon-Rangsummentest. Statistische Testergebnisse mit einem p-Wert unter $\alpha = 5\%$ wurden als signifikant bewertet, wobei bei der Durchführung mehrerer statistischer Signifikanztests mit den gleichen Daten die Bonferroni-Korrektur angewendet wurde.

2.4 Ergebnisse

Phänotypische und funktionelle Charakterisierung BKV-spezifischer T-Zellen

Die Sensitivität des Nachweises BKV-spezifischer CD4⁺ T-Zellen konnte durch die Stimulation mit einem BKV-Gesamtpeptidmix, bestehend aus den Strukturproteinen VP1-3 und den regulatorischen Proteinen small t-Antigen und Large T-Antigen, im Vergleich zur Einzelstimulation mit den überlappenden Peptidpools der 5 BKV-Proteine für Interferon- γ -, Interleukin-2- und Tumornekrosefaktor- α -produzierende CD4⁺ T-Zellen signifikant verbessert werden ($p > 0,05$). Während nach Stimulation mit dem BKV-Gesamtpeptidmix bei allen Patienten (100 %) aller untersuchten Gruppen Interferon- γ -, Interleukin-2- und Tumornekrosefaktor- α -produzierende CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen werden konnten, zeigten nach Einzelstimulation 64 % aller Patienten Interferon- γ -, 95 % aller Patienten Interleukin-2- und 85 % aller Patienten Tumornekrosefaktor- α -produzierende CD4⁺ T-Zellen, die gegen mindestens eines der 5 BKV-Proteine gerichtet sind. Zudem konnten nach Stimulation mit dem BKV-Gesamtpeptidmix signifikant höhere Frequenzen Interferon- γ -, Interleukin-2- und Tumornekrosefaktor- α -produzierender CD4⁺ T-Zellen als nach Einzelstimulation gemessen werden ($p < 0,05$).

Die Frequenzen BKV-spezifischer Interferon- γ - und Interleukin-2-produzierender CD4⁺ T-Zellen waren dabei bei Patienten nach BKV-assoziiertes Nephropathie signifikant höher als bei Patienten mit transiente BKV-Reaktivierung und Patienten ohne BKV-Reaktivierung ($p < 0,05$). Bei Einzelstimulation mit den 5 BKV-Proteinen erreichte der Unterschied zwischen den Frequenzen nur für die Strukturproteine VP1-3 statistische Signifikanz ($p < 0,05$).

Auch die Sensitivität des Nachweises BKV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen konnte durch die Stimulation mit dem BKV-Gesamtproteinmix signifikant verbessert werden. Während bei allen Patienten (100 %) Interferon- γ -produzierende CD8⁺ T-Zellen nachweisbar waren, konnten Interleukin-2-produzierende CD8⁺ T-Zellen bei 59 % der Patienten und Tumornekrosefaktor- α -produzierende CD8⁺ T-Zellen bei 49 % der Patienten nachgewiesen werden.

91 % der Patienten mit BKV-assoziiertes Nephropathie, 100 % der Patienten mit transiente BKV-Reaktivierung und 100 % der Patienten ohne BKV-Reaktivierung zeigten BKV-spezifische T-Zellen, die gleichzeitig Interferon- γ -, Interleukin-2- und Tumornekrosefaktor- α exprimierten. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die Frequenzen multifunktionaler BKV-spezifischer Interferon- γ /Interleukin-2/Tumornekrosefaktor- α -produzierender CD4⁺ T-Zellen signifikant höher bei Patienten nach transiente BKV-Reaktivierung als nach BKV-assoziiertes Nephropathie waren ($p = 0,048$). Nach Einzelstimulation mit den 5 BKV-Proteinen

konnte ein statistisch signifikanter Unterschied nur nach Stimulation mit Large T-Antigen festgestellt werden ($p = 0,01$). Multifunktionale Interleukin-2/Tumornekrosefaktor- α -produzierende CD4⁺ T-Zellen wurden bei 91 % der Patienten aus Gruppe 1, 100 % der Patienten aus Gruppe 2 und 92 % der Patienten aus Gruppe 3 nachgewiesen. Multifunktionale BKV-spezifische CD8⁺ T-Zellen konnten nur vereinzelt, Interleukin-17-produzierende T-Zellen bei keinem Patienten in den untersuchten Gruppen gemessen werden.

Kinetik der BKV-spezifischen zellulären und humoralen Immunität

Alle 18 Patienten (100 %) hatten bei Diagnose der BKV-Reaktivierung nicht nachweisbare bzw. niedrige Frequenzen BKV-spezifischer T-Zellen. Patienten mit transienter BKV-Reaktivierung (Gruppe 2) entwickelten signifikant erhöhte Frequenzen BKV-spezifischer T-Zellen ($p < 0,05$) im Median einen Monat (Spannweite [1-3]) nach Diagnose der BKV-Reaktivierung. Bei 7 von 11 Patienten (64 %) fiel der Anstieg BKV-spezifischer T-Zellen mit dem Ende der BKV-Reaktivierung zusammen. Bei 4 von 11 Patienten (36 %) ging der Anstieg BKV-spezifischer T-Zellen dem Ende der BKV-Reaktivierung im Median einen Monat (Spannweite [1-3]) voraus.

Patienten mit BKV-assoziiierter Nephropathie (Gruppe 1) entwickelten signifikant erhöhte Frequenzen BKV-spezifischer T-Zellen ($p < 0,05$) im Median 5 Monate (Spannweite [2-10]) nach Diagnose der BKV-Reaktivierung und erst nach Reduktion der Immunsuppression. Während zu diesem Zeitpunkt BKV-spezifische T-Zellen gegen Strukturproteine signifikant höher waren als bei Diagnose ($p < 0,05$), zeigte sich kein Unterschied für BKV-spezifische T-Zellen gegen regulatorische Proteine ($p > 0,05$). Bei 12 von 18 Patienten (67 %) waren BKV-spezifische T-Zellen gegen Strukturproteine früher nachweisbar als BKV-spezifische T-Zellen gegen regulatorische Proteine. Bei 6 von 18 Patienten (33 %) waren BKV-spezifische T-Zellen gegen alle BKV-Proteine gleichzeitig detektierbar. Am Ende der BKV-Reaktivierung waren BKV-spezifische T-Zellen gegen alle BKV-Proteine signifikant erhöht ($p < 0,05$). Obwohl die Frequenzen VP1-spezifischer T-Zellen in einigen Patienten höher waren, konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den 5 untersuchten BKV-Proteinen festgestellt werden ($p > 0,05$). Patienten mit BKV-assoziiierter Nephropathie hatten im Median 21 Wochen nach Diagnose der BKV-Reaktivierung nachweisbare BKV-spezifische T-Zellen gegen Strukturproteine. Die Entwicklung BKV-spezifischer T-Zellen gegen regulatorische Proteine folgte im Median 27 Wochen nach Diagnose der BKV-Reaktivierung und ging mit einem Abfall der BKV-spezifischen Viruslast und im Median innerhalb von 4 Wochen mit einem Ende der BKV-Reaktivierung einher. Die Frequenzen BKV-spezifischer T-Zellen waren 6 Monate nach Ende der BKV-Reaktivierung signifikant höher als bei Diagnose ($p < 0,05$).

Bei Diagnose der BKV-Reaktivierung zeigte sich kein Unterschied in den Frequenzen BKV-spezifischer T-Zellen zwischen Gruppe 1 und Gruppe 2 ($p > 0,05$). Am Ende der BKV-Reaktivierung hingegen waren die Frequenzen BKV-spezifischer T-Zellen signifikant höher bei Patienten mit BKV-assoziiierter Nephropathie als bei Patienten mit transienter BKV-Reaktivierung ($p < 0,05$). Auch 6 Monate nach Ende der BKV-Reaktivierung waren die Frequenzen BKV-spezifischer T-Zellen in Gruppe 1 höher als in Gruppe 2 ($p < 0,05$).

BKV-spezifische IgG-Antikörper zeigten bei allen 18 Patienten einen signifikanten Anstieg von der Diagnose bis zum Ende der BKV-Reaktivierung ($p < 0,05$). BKV-spezifische IgM-Antikörper waren bei Diagnose und am Ende der BKV-Reaktivierung signifikant höher als vor BKV-Reaktivierung ($p < 0,05$). Im Vergleich zu den Frequenzen BKV-spezifischer T-Zellen zeigte sich weder bei Diagnose noch am Ende der BKV-Reaktivierung ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit BKV-assoziiierter Nephropathie und Patienten mit transienter BKV-Reaktivierung in der Höhe BKV-spezifischer IgM- und IgG-Antikörper ($p > 0,05$). Während Patienten der Gruppe 2 einen transienten Anstieg BKV-spezifischer IgM-Antikörper zeigten, konnte bei Patienten der Gruppe 1 eine Persistenz BKV-spezifischer IgM-Antikörper auch 6 Monate nach Ende der BKV-Reaktivierung nachgewiesen werden ($p < 0,05$).

2.5 Diskussion

Bisherige Arbeiten zeigen BKV-spezifische T-Zellantworten gegen das Strukturprotein VP1 und das regulatorische Large T-Antigen in Querschnittstudien und lassen einen Zusammenhang mit der Kontrolle der BKV-Reaktivierung erkennen.¹²⁻¹⁶ Das Potential eines Immunmonitorings zur Risikostratifizierung bei BKV-Reaktivierung konnte jedoch aufgrund der fehlenden wissenschaftlichen Erkenntnisse nicht adressiert werden. Die vorliegenden Arbeiten zeigen erstmals die Kinetik der BKV-spezifischen Immunität gegen 5 BKV-Proteine und unterscheiden zudem zwischen Patienten mit bioptisch gesicherter BKV-assoziiierter Nephropathie und transienter BKV-Reaktivierung. Es wird erstmals die Rolle multifunktionaler BKV-spezifischer T-Zellen in der Kontrolle der BKV-Reaktivierung untersucht.

Unsere Ergebnisse lassen einen Zusammenhang zwischen der Entwicklung erhöhter Frequenzen BKV-spezifischer T-Zellen, die gegen alle untersuchten BKV-spezifischen Proteine gerichtet sind, und dem Ende der BKV-Reaktivierung bzw. BKV-assoziierten Nephropathie vermuten. Während bisher nur BKV-spezifische T-Zellen nach Stimulation mit VP1 und Large T-Antigen untersucht wurden¹⁴⁻¹⁷, zeigen unsere Ergebnisse deutlich, dass zur genauen Abbildung der BKV-spezifischen Immunität auch VP2, VP3 und small t-Antigen eingeschlossen werden

müssen. Die BKV-spezifische T-Zellantwort gegen Strukturproteine scheint ein sensitiver Marker für eine BKV-Reaktivierung zu sein und ist bei Patienten mit BKV-assoziiierter Nephropathie früher detektierbar als die BKV-spezifische T-Zellantwort gegen regulatorische Proteine. Von besonderem Interesse und prognostischer Bedeutung ist die gegen small t-Antigen und Large T-Antigen gerichtete T-Zellantwort, die mit dem Ende der BKV-Reaktivierung korreliert und einen sensitiven Marker für die Kontrolle der BKV-Reaktivierung darstellt. Die Frequenzen BKV-spezifischer T-Zellen bei Patienten mit BKV-assoziiierter Nephropathie sind sowohl am Ende der BKV-Reaktivierung als auch Monate später im Vergleich zu Patienten mit transienter BKV-Reaktivierung signifikant erhöht. Sowohl die Reduktion der Immunsuppression bei Patienten mit BKV-assoziiierter Nephropathie als auch die lange Exposition gegenüber einer signifikant höheren BKV-Virämie können zu diesem Unterschied beigetragen haben.

Alle Patienten mit BKV-Reaktivierung zeigen einen signifikanten Anstieg BKV-spezifischer IgG-Antikörper von der Diagnose bis zum Ende der BKV-Reaktivierung. Unsere Ergebnisse können jedoch keinen Zusammenhang zwischen der Schwere und Dauer der BKV-Reaktivierung und der Höhe der BKV-spezifischen IgG-Antikörper nachweisen. Der Anstieg BKV-spezifischer IgG-Antikörper korreliert nicht mit dem Ende der BKV-Reaktivierung. Der Anstieg BKV-spezifischer IgM-Antikörper im Verlauf der BKV-Reaktivierung lässt auf eine akute Immunantwort gegen BKV schließen. Interessanterweise wird bei Patienten mit BKV-assoziiierter Nephropathie eine Persistenz BKV-spezifischer IgM-Antikörper auch Monate nach Ende der BKV-Reaktivierung festgestellt. Dies könnte Ausdruck eines eingeschränkten Immunglobulin-Klassen-Switch sein, der durch Immunsuppression, Besonderheiten des BKV-Genotyps oder individueller Faktoren von Spender oder Empfänger hervorgerufen wird.

Erstaunlicherweise zeigen sich signifikant erhöhte Frequenzen multifunktionaler BKV-spezifischer CD4⁺ T-Zellen bei Patienten nach transienter BKV-Reaktivierung im Vergleich zu Patienten nach BKV-assoziiierter Nephropathie. Unter der Annahme, dass die nachgewiesene T-Zellantwort das Muster der zellulären Immunität zum Zeitpunkt der Kontrolle der Virusreplikation abbildet, bestätigen unsere Ergebnisse bisherige Studien, dass multifunktionale CD4⁺ T-Zellen eine effektive Kontrolle der Virusreplikation und eine protektive Funktion bei Infektionen mit CMV, EBV oder HSV vermitteln.^{17,18} Nachdem multifunktionale CD8⁺ T-Zellen nur vereinzelt nachweisbar sind, lassen unsere Ergebnisse zudem vermuten, dass eine entscheidende Effektorfunktion von CD4⁺ T-Zellen übernommen wird. Grund für diese Beobachtung können häufige Restimulationen der BKV-spezifischen T-Zellen durch fortbestehende Exposition gegenüber BKV-spezifischen Proteinen und wiederholte BKV-Reaktivierungen sein. Durch die Stimulation mit dem BKV-Gesamtpeptidmix im Vergleich zur

Einzelstimulation mit den 5 BKV-Proteinen konnte eine sensitive und valide Methode zur Bestimmung BKV-spezifischer T-Zellen etabliert werden, die eine phänotypische und multifunktionale Charakterisierung erlaubt. Im Besonderen konnten durch diese Methode BKV-spezifische CD8⁺ T-Zellen bei allen untersuchten Patienten nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeiten sprechen für das diagnostische und prognostische Potential des BKV-spezifischen Immunmonitorings bei Patienten mit BKV-Reaktivierung. Das Monitoring BKV-spezifischer T-Zellen bei Patienten mit klinisch relevanten BKV-Viruslasten kann als sensitiver Parameter für das Risiko einer BKV-assoziierten Nephropathie eingesetzt werden. Hierbei könnte ein Monitoring BKV-spezifischer T-Zellen für 1 bis 3 Monate nach Diagnose einer BKV-Reaktivierung erfolgen. Erhöhte Frequenzen BKV-spezifischer T-Zellen gegen Struktur- und regulatorische Proteine während aktiver BKV-Reaktivierung ohne therapeutische Intervention stellen dabei einen geeigneten Prognoseparameter für eine transiente BKV-Reaktivierung dar. Dementgegen weist der fehlende Nachweis BKV-spezifischer T-Zellen ohne Reduktion der Immunsuppression auf ein erhöhtes Risiko für das Fortschreiten zu einer BKV-assoziierten Nephropathie hin. Das Monitoring BKV-spezifischer T-Zellen kann hierbei einen entscheidenden zeitlichen Vorteil gegenüber der Bestimmung der BKV-Viruslast im Serum liefern und bei Patienten mit relevanter BK-Virämie, aber fehlendem Nachweis BKV-spezifischer T-Zellen, eine frühzeitige therapeutische Intervention rechtfertigen. Bei Patienten mit BKV-assoziiierter Nephropathie kann das Monitoring der BKV-spezifischen Immunantwort überdies als immunologischer Parameter zur Kontrolle der Reduktion der Immunsuppression herangezogen werden. Hierbei liegt das Ziel darin, zum einen die ausreichende Entwicklung BKV-spezifischer T-Zellen zu erlauben, zum anderen aber eine adäquate Immunsuppression zum Schutz vor Abstoßungsreaktionen zu gewährleisten.

Die wichtige Frage, ob ein Monitoring der BKV-spezifischen Immunantwort zudem bereits vor BKV-Reaktivierung genutzt werden kann, um zwischen Patienten mit erhöhtem Risiko für eine BKV-Reaktivierung im Allgemeinen und für eine BKV-assoziierte Nephropathie im Speziellen unterscheiden zu können, kann durch die vorliegenden Arbeiten jedoch nicht beantwortet werden. Hierfür ist die Durchführung einer prospektiven Studie mit geeigneten Monitoringintervallen im frühen Verlauf nach Nierentransplantation notwendig. In diesem Zusammenhang sollte auch evaluiert werden, inwieweit weitere immunologische Messwerte wie Parameter der unspezifischen Immunität, Zytokinprofile und die BKV-spezifische Immunität von Spender und Empfänger vor Transplantation die Sensitivität der Risikostratifizierung verbessern können.

2.6 Literatur

1. Gardner SD, Field AM, Coleman DV, Hulme B. New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet* 1971;1:1253-7.
2. Wadei HM, Rule AD, Lewin M, et al. Kidney transplant function and histological clearance of virus following diagnosis of polyomavirus-associated nephropathy (PVAN). *Am J Transplant* 2006;6:1025-32.
3. Brennan DC, Agha I, Bohl DL, et al. Incidence of BK with tacrolimus versus cyclosporine and impact of preemptive immunosuppression reduction. *Am J Transplant* 2005;5:582-94.
4. Imperiale MJ. The human polyomaviruses: An overview. In: Khalili K, Stoner GL, eds. *Human polyomaviruses: Molecular and clinical perspectives*. New York, USA: Wiley-Liss, 2001:53-71.
5. Hirsch HH, Knowles W, Dickenmann M, et al. Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients. *N Engl J Med* 2002;347:488-96.
6. Mengel M, Marwedel M, Radermacher J, et al. Incidence of polyomavirus-nephropathy in renal allografts: influence of modern immunosuppressive drugs. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:1190-6.
7. Schaub S, Hirsch HH, Dickenmann M, et al. Reducing immunosuppression preserves allograft function in presumptive and definitive polyomavirus-associated nephropathy. *Am J Transplant* 2010;10:2615-23.
8. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2009;9(Suppl 3):44-58.
9. Babel N, Fendt J, Karaivanov S, et al. BK viraemia as an early marker for the development of BKV-associated nephropathy: Analysis of 4128 urine and serum samples. *Transplantation* 2009;88:89-95.
10. Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Hirsch HH, et al. Histological patterns of polyomavirus nephropathy: correlation with graft outcome and viral load. *Am J Transplant* 2004;4:2082-92.
11. Nickeleit V, Hirsch HH, Binet IF, et al. Polyomavirus infection of renal allograft recipients: from latent infection to manifest disease. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:1080-9.
12. Binggeli S, Egli A, Schaub S, et al. Polyomavirus BK-Specific Cellular Immune Response to VP1 and Large T-Antigen in Kidney Transplant Recipients. *Am J Transplant* 2007;7:1131-9.

13. Comoli P, Binggeli S, Ginevri F, Hirsch HH. Polyomavirus-associated nephropathy: Update on BK virus-specific immunity. *Transpl Infect Dis* 2006;8:86-94.
14. Ginevri F, Azzi A, Hirsch HH, et al. Prospective monitoring of polyomavirus BK replication and impact of preemptive intervention in pediatric kidney recipients. *Am J Transplant* 2007;7:2727-35.
15. Prosser SE, Orentas RJ, Jurgens L, Cohen EP, Hariharan S. Recovery of BK virus Large T-antigen-specific cellular immune response correlates with resolution of BK virus nephritis. *Transplantation* 2008;85:185-92.
16. Babel N, Volk HD, Reinke P. BK polyomavirus infection and nephropathy: the virus-immune system interplay. *Nat Rev Nephrol* 2011;24:399-406.
17. Binggeli S, Egli A, Dickenmann M, et al. BKV replication and cellular immune responses in renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2006;6:2218-9.
18. Harari A, Vallelian F, Meylan PR, et al. Functional heterogeneity of memory CD4 T-cell responses in different conditions of antigen exposure and persistence. *J Immunol* 2005;174:1037-45.

3. Anteilserklärung

Publikation 1

Thomas Schachtner, Karin Müller, Maik Stein, Claudia Diezemann, Anett Sefrin, Nina Babel, Petra Reinke. *BKV-specific immunity kinetics: a predictor of recovery from polyomavirus BK-associated nephropathy*. American Journal of Transplantation 2011;11:2443-2452. PubMed PMID: 21831150.

Anteil des Promovenden: 90 %

Beitrag: Studiendesign, Adaption des Elispot-Assay zur Detektion virusspezifischer T-Zellen auf den Nachweis BKV-spezifischer T-Zellen, Etablierung des ELISA zur Messung BKV-spezifischer Antikörper, Durchführung der Experimente (Elispot, ELISA, PCR), Datenauswertung und statistische Analyse, Schreiben und Einreichen des Manuskripts, Beantwortung der Fragen der Reviewer.

Publikation 2

Karin Müller, Thomas Schachtner, Arne Sattler, Sarah Meier, Peter Friedrich, Hanna Trydzenskaya, Carl Hinrichs, Ralf Trappe, Andreas Thiel, Petra Reinke, Nina Babel. *BK-VP3 as a new target of cellular immunity in BK virus infection*. Transplantation 2011;91:100-107. PubMed PMID: 21452414.

Anteil des Promovenden: 30 %

Beitrag: Beteiligung an Entwurf und Durchführung des Studiendesigns, Einteilung und Charakterisierung der Patientengruppen, Etablierung des ELISA zur Messung BKV-spezifischer Antikörper, Datenauswertung und statistische Analyse, Beteiligung an der Durchführung von Experimenten (ELISA, PCR, PBMC Isolierung), Beantwortung der Fragen der Reviewer.

Publikation 3

Hanna Trydzenskaya, Arne Sattler, Karin Müller, Thomas Schachtner, Chantip Dang-Heine, Peter Friedrich, Peter Nickel, Jan Hörstrup, Ralf Schindler, Andreas Thiel, Matthias Melzig, Petra Reinke, Nina Babel. *Novel approach for improved assessment of phenotypic and functional characteristics of BKV-specific T-cell immunity.* Transplantation 2011;92:1269-1277. PubMed PMID: 22124284.

Anteil des Promovenden: 30 %

Beitrag: Beteiligung an Entwurf und der Durchführung des Studiendesigns, Einteilung und Charakterisierung der Patientengruppen, Etablierung des ELISA zur Messung BKV-spezifischer Antikörper, Datenauswertung und statistische Analyse, Beteiligung an der Durchführung von Experimenten (ELISA, PCR, PBMC Isolierung), Beantwortung der Fragen der Reviewer.

Ort, Datum

Unterschrift

4. Ausgewählte Publikationen

4.1 Publikation 1

Thomas Schachtner, Karin Müller, Maik Stein, Claudia Diezemann, Anett Sefrin, Nina Babel, Petra Reinke. *BKV-specific immunity kinetics: a predictor of recovery from polyomavirus BK-associated nephropathy*. American Journal of Transplantation 2011;11:2443-2452. PubMed PMID: 21831150.

Impact Factor: 6.048

4.2 Publikation 2

Karin Müller, Thomas Schachtner, Arne Sattler, Sarah Meier, Peter Friedrich, Hanna Trydzenskaya, Carl Hinrichs, Ralf Trappe, Andreas Thiel, Petra Reinke, Nina Babel. *BK-VP3 as a new target of cellular immunity in BK virus infection*. *Transplantation* 2011;91:100-107. PubMed PMID: 21452414.

Impact Factor: 3.676

4.3 Publikation 3

Hanna Trydzenskaya, Arne Sattler, Karin Müller, Thomas Schachtner, Chantip Dang-Heine, Peter Friedrich, Peter Nickel, Jan Hörstrup, Ralf Schindler, Andreas Thiel, Matthias Melzig, Petra Reinke, Nina Babel. *Novel approach for improved assessment of phenotypic and functional characteristics of BKV-specific T-cell immunity.* Transplantation 2011;92:1269-1277. PubMed PMID: 22124284.

Impact Factor: 3.676

5. Lebenslauf

Der Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version nicht mitveröffentlicht.

6. Komplette Publikationsliste

Originalarbeiten

Thomas Schachtner, Karin Müller, Maik Stein, Claudia Diezemann, Anett Sefrin, Nina Babel, Petra Reinke. *BKV-specific immunity kinetics: a predictor of recovery from polyomavirus BK-associated Nephropathy*. American Journal of Transplantation 2011;11:2443-2452.

Karin Müller, Thomas Schachtner, Arne Sattler, Sarah Meier, Peter Friedrich, Hanna Trydzenskaya, Carl Hinrichs, Ralf Trappe, Andreas Thiel, Petra Reinke, Nina Babel. *BK-VP3 as a new target of cellular immunity in BK virus infection*. Transplantation 2011;91:100-107.

Hanna Trydzenskaya, Arne Sattler, Karin Müller, Thomas Schachtner, Chantip Dang-Heine, Peter Friedrich, Peter Nickel, Jan Hörstrup, Ralf Schindler, Andreas Thiel, Matthias Melzig, Petra Reinke, Nina Babel. *Novel approach for improved assessment of phenotypic and functional characteristics of BKV-specific T-cell immunity*. Transplantation 2011;92:1269-1277.

Peter Liman, Nina Babel, Thomas Schachtner, Nadine Unterwalder, Julian König, Jörg Hofmann, Petra Reinke, Peter Nickel. *Mannose-binding lectin deficiency is not associated with increased risk for polyomavirus nephropathy*. Transplant Immunology 2011; [Epub ahead of print].

Vorträge und publizierte Abstracts

Thomas Schachtner, Karin Müller, Maik Stein, Nina Babel, Petra Reinke. *Immunodominant VP1 and 4 other subdominant antigens as important targets of BKV-specific immunity in KT patients with BKV-infection*. American Transplant Congress, Boston (USA), Mai 2009; American Journal of Transplantation 9 (Supplement 2) 293 (2009).

Thomas Schachtner, Karin Müller, Maik Stein, Claudia Diezemann, Christa Liebenthal, Evelyn Lieske, Anett Sefrin, Nina Babel, Petra Reinke. *Kinetics of polyomavirus BK-specific humoral and cellular immunity in the first year after kidney transplantation correlate with intensity of BKV-infection*. American Transplant Congress, San Diego (USA), April 2010; American Journal of Transplantation 10 (Supplement 4) 454 (2010).

Thomas Schachtner, Maik Stein, Claudia Diezemann, Christa Liebenthal, Evelyn Lieske, Anett Sefrin, Nina Babel, Petra Reinke. *Monitoring of BKV-specific cellular and humoral immunity: a new strategy for risk assessment and therapeutic management of BKV-associated nephropathy*. ERA-EDTA Congress, München (Deutschland), Mai 2010.

Karin Müller, Thomas Schachtner, Arne Sattler, Sarah Meier, Gordon Brestrich, Carl Hinrichs, Andreas Thiel, Petra Reinke, Nina Babel. *VP3-specific multifunctional CD4-positive T cells as a new marker of cellular immunity in patients with BKV-associated nephropathy*. American Transplant Congress, Boston (USA), Mai 2009; American Journal of Transplantation 9 (Supplement 2) 292 (2009).

Nina Babel, Thomas Schachtner, Karin Müller, Arne Sattler, Andreas Thiel, Hans-Dieter Volk, Petra Reinke. *Modification of immunosuppression can enhance the reconstitution of BKV-specific immunity preventing graft failure due to BKV-associated nephropathy in renal transplant patients*. International Congress of the Transplantation Society, Vancouver (Kanada), August 2010; Transplantation 90 (Supplement) 162 (2010).

Hanna Trydzenskaya, Arne Sattler, Karin Müller, Thomas Schachtner, Andreas Thiel, Hans-Dieter Volk, Petra Reinke, Nina Babel. *New protocol of BKV-specific T cell analysis allows for improved assessment of phenotypic and functional characteristics of BKV-specific immunity*. International Congress of the Transplantation Society, Vancouver (Kanada), August 2010; Transplantation 90 (Supplement) 1776 (2010).

Nina Babel, Karin Müller, Avidan Neumann, Hanna Trydzenskaya, Arne Sattler, Eva Novotna, Thomas Schachtner, Andreas Thiel, Petra Reinke. *BK viral drop can be predicted by increase of BKV-specific polyfunctional T-cells*. American Transplant Congress, Philadelphia (USA), April 2011; American Journal of Transplantation 11 (Supplement 2) 504 (2011).

Poster und publizierte Abstracts

Thomas Schachtner, Maik Stein, Claudia Diezemann, Nina Babel, Petra Reinke. *Disseminated CMV infection might trigger BKV replication early after kidney transplantation*. World Congress of Nephrology, Mailand (Italien), Mai 2009.

Thomas Schachtner, Karin Müller, Maik Stein, Claudia Diezemann, Nina Babel, Petra Reinke. *Immunodominant VP1 and 4 other subdominant antigens as important targets of BKV-specific immunity in KT patients with BKV-infection*. World Congress of Nephrology, Mailand (Italien), Mai 2009.

Thomas Schachtner, Maik Stein, Nina Babel, Petra Reinke. *Acute CMV infection might trigger early-onset BKV replication in kidney transplant recipients*. American Transplant Congress, Boston (USA), Mai 2009; American Journal of Transplantation 9 (Supplement 2) 793 (2009).

Thomas Schachtner, Karin Müller, Maik Stein, Claudia Diezemann, Christa Liebenthal, Evelyn Lieske, Nina Babel, Petra Reinke. *Impaired class switching to BKV-specific immunoglobulin G might be critical for the development of polyomavirus BK-associated nephropathy*. American Transplant Congress, San Diego (USA), April 2010; American Journal of Transplantation 10 (Supplement 4) 1439 (2010).

Thomas Schachtner, Karin Müller, Maik Stein, Claudia Diezemann, Christa Liebenthal, Evelyn Lieske, Anett Sefrin, Nina Babel, Petra Reinke. *Recovery of polyomavirus BK-specific cellular and humoral immunity as a predictor of therapeutic efficiency and recovery from BKV-associated nephropathy*. American Transplant Congress, San Diego (USA), April 2010; American Journal of Transplantation 10 (Supplement 4) 1438 (2010).

Karin Müller, Thomas Schachtner, Eva Novotna, Carl Hinrichs, Peter Nickel, Petra Reinke, Nina Babel. *BKV-specific polyfunctional and single IFN γ -producing T cells might determine the clinical course of BKV infection in renal transplant patients*. American Transplant Congress, San Diego (USA), April 2010; American Journal of Transplantation 10 (Supplement 4) 1441 (2010).

Benjamin Weist, Birgit Rudolph, Olaf Dirsch, Thomas Schachtner, Eva Novotna, Petra Reinke, Nina Babel. *Increased expression of PD1 and PD1-L might be involved into the pathogenesis of BKV-associated nephropathy in renal transplant patients*. American Transplant Congress, San Diego (USA), April 2010; American Journal of Transplantation 10 (Supplement 4) 1498 (2010).

Hanna Trydzenskaya, Arne Sattler, Karin Müller, Thomas Schachtner, Andreas Thiel, Hans-Dieter Volk, Petra Reinke, Nina Babel. *A novel approach for improved assessment of phenotypic and functional characteristics of the BKV-specific T-cell immunity*. American Transplant Congress, Philadelphia (USA), April 2011; American Journal of Transplantation 11 (Supplement 2) 774 (2011).

Karin Müller, Avidan Neumann, Hanna Trydzenskaya, Arne Sattler, Eva Girmanova, Thomas Schachtner, Andreas Thiel, Petra Reinke, Nina Babel. *New marker of BKV specific cellular immunity for prediction of clinical outcome in posttransplant BKV infection*. Basic Science Symposium, Boston (USA), Juni 2011.

7. Selbständigkeitserklärung

„Ich, Thomas Schachtner, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *„Charakterisierung der Polyomavirus BK-spezifischen Immunantwort nach Nierentransplantation“* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Ort, Datum

Unterschrift

8. Danksagung

An erster Stelle steht selbstverständlich meine Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Petra Reinke. Ihr danke ich nicht nur für die hervorragenden Forschungsbedingungen und die Möglichkeit der Durchführung dieser Dissertation, sondern ganz besonders für die zahlreichen langen wissenschaftlichen Diskussionen, ihre konstruktive Kritik und die unschätzbare wertvollen Erfahrungen und Ratschläge, die meinen beruflichen Werdegang so entscheidend beeinflusst haben. Das entgegengebrachte Vertrauen, die Wertschätzung meiner Arbeit und das Bemühen mir das Handwerkszeug für eine wissenschaftliche Karriere beizubringen, haben nicht nur zur Begeisterung und Freude an der Forschung geführt, sondern haben mein Interesse auf einen spannenden und interessanten Fachbereich gelenkt.

Ein herzlicher Dank gilt Frau PD Dr. med. Nina Babel für die wissenschaftliche Betreuung und die vielen Denkanstöße. Durch ihre Motivation, die ständige Ansprechbarkeit und die sehr vertrauensvolle Zusammenarbeit hat sie ganz wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Maik Stein und Claudia Diezemann danke ich nicht nur für die exzellente Einarbeitung in die Methodik sondern ganz besonders für das Vergnügen und die unglaublich angenehme Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft in den letzten Jahren, die über so manche Probleme ganz einfach hinwegzusehen geholfen haben.

Ebenso gilt mein Dank allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Immunologie, des BCRT und der Nierentransplantationsambulanz; ganz besonders aber Anett Sefrin, Christa Liebenthal, Kristin Neuhaus und Karin Müller für die wissenschaftliche Unterstützung und die interessante, produktive und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Der mit Abstand wichtigste Dank geht an meine Familie für ihre unermüdliche Unterstützung, ihr uneingeschränktes Vertrauen und ihren immer felsenfesten Glauben an mich. Ohne sie wäre weder die Durchführung des Studiums noch die Erstellung dieser Promotion möglich gewesen; und schon gar nicht dieses „Gesamtergebnis“.