

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

DISSERTATION

**Persistierende BK-Viruslast im Urin als ein früher Marker für die
Entwicklung einer BKV-assoziierten Nephropathie bei
nierentransplantierten Patienten**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Juliane Fendt

aus Berlin

Gutachter/in: 1. Priv.-Doz. Dr. med. N. Babel
 2. Prof. Dr. med. I. A. Hauser
 3. Prof. Dr. med. M. Fischereeder

Datum der Promotion: 19.11.2010

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

Abstract

1. Einleitung	8
1.1 Allgemeine Einführung	8
1.2 Polyomaviridae.....	11
1.3 BK-Virus - klinische Manifestationsformen	12
1.4 Besondere Charakteristika der BK-Virus-Infektion.....	13
1.5 Grundlagen der BKVAN.....	14
1.5.1 Epidemiologie	14
1.5.2 Entstehung der BKVAN.....	14
1.5.3 Risikofaktoren	15
1.5.4 Klinische Präsentation und Diagnostik	16
1.5.5 Therapieoptionen.....	17
1.5.6 Prognose der BKVAN.....	20
1.5.7 Erneute Transplantation nach BKVAN?.....	20
1.6 Fragestellung	21
 2. Material und Methoden.....	 22
Experimenteller Teil	
2.1 Tabelle 1: Apparative Ausstattung.....	22
2.2 Tabelle 2: Reagenzien/ Chemikalien.....	23
2.3 Tabelle 3: QIAamp Ultra Sens Virus Kit (250)	24
2.4 Proben.....	25
2.5 Laborablauf	25
2.5.1 Sicherheitsvorkehrungen.....	25
2.5.2 Aufbereitung des Blutes	26
2.5.3 Aufbereitung des Urins	26

2.5.4	Gemeinsame Schritte der Weiterverarbeitung	27
2.5.4.1	DNA-Präparation	27
2.5.5	Real-Time-PCR (TaqMan-PCR).....	29
2.5.5.1	Vorwort Real-Time-PCR	29
2.5.5.2	Ablauf der Real-Time-PCR.....	29
2.5.6	Auswertung der TaqMan-PCR.....	32
2.5.7	Erstellung der Standardkurve	33
2.5.8	Ansatz und Durchführung der TaqMan (Real-Time)-PCR.....	34
2.5.8.1	Verwendete Primer und Sonden.....	34
2.5.8.2	TaqMan-Vorbereitungen	35
2.5.8.3	Durchführung der TaqMan-PCR.....	35

Klinischer Teil

2.6	Studienaufbau/ Studienpopulation	36
2.7	Histologische Untersuchungsbefunde und Diagnose der BKVAN.....	36
2.8	Statistische Analyse.....	36

3. Ergebnisse **38**

3.1	prospektive Längsschnittstudie	38
3.1.1	Studienpopulation - Basischarakteristika	38
3.1.2	Ablauf der prospektiven Längsschnittstudie	39
3.1.3	Immunsuppressive Therapie.....	39
3.1.4	Behandlung der BKV-Infektion	39
3.1.5	Assoziation zw. BKV-Reaktivierung und akuter Transplantatabstoßung... 40	
3.1.6	BK-Virurie und klinische Patientencharakteristika im Vergleich.....	41
3.2	BK-Viruslast-Kinetik	42
3.2.1	Untersuchung der BK-Viruslast-Kinetik.....	42
3.2.2	BK-Viruslast-Kinetik und Entwicklung einer BKVAN.....	45

3.3	Korrelation der BK- Virurie und BK- Virämie	45
3.3.1	Prävalenz der BK-Virurie und BK-Virämie	45
3.3.2	Zusammenhang zwischen BK-Virurie und BK-Virämie	46
3.3.3	Vergleich der prädiktiven Werte von BK-Virurie und BK-Virämie.....	49
4.	Diskussion.....	50
5.	Abkürzungsverzeichnis	56
6.	Abbildungsverzeichnis.....	59
7.	Tabellenverzeichnis.....	60
8.	Literaturverzeichnis	61

Zusammenfassung

Hintergrund: Die BK-Virusreaktivierung spielt bei der Entwicklung der BK-Virus assoziierten Nephropathie (BKVAN) bei nierentransplantierten Patienten eine kausale Rolle. Infolge der derzeit fehlenden Option einer effektiven antiviralen Therapie steht die frühe Diagnosestellung der BKV-Reaktivierung an erster Stelle bei der Prävention einer BVKAN. Aufgrund seiner Persistenz in den uroepithelialen Zellen erfolgt die Ausscheidung vom BK-Virus im Falle einer Reaktivierung zunächst im Urin bevor das Virus die Endothelzellbarriere der Kapillaren durchbricht, in die Blutbahn übergeht und dort detektiert werden kann.

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde der prädiktive Wert der BK-Virurie hinsichtlich der Entwicklung einer BK-Virämie sowie einem möglichen zeitlichen Vorteil zur frühen Vorhersage einer BKVAN analysiert.

Methode: Zusammenfassend wurden 4128 Urin- und Serumproben von nierentransplantierten Patienten mit Hilfe der real-time PCR auf BK-Viruslast analysiert. Es erfolgte die Untersuchung von insgesamt 433 Patienten anhand einer Querschnittsuntersuchung, von denen 233 Patienten für eine prospektive Longitudinalstudie herausselektiert wurden. In der Längsschnittuntersuchung wurden im Durchschnitt 7 Messungen pro Patient im ersten Jahr post transplantationem durchgeführt.

Ergebnisse: Insgesamt konnte bei 7% der Patienten eine BK-Virämie und bei 19% eine BK-Virurie detektiert werden. Persistierende Virurie wies eine Sensitivität von 100% und Spezifität von 94% für eine BK-Virämie auf. Im Gegensatz zu Patienten mit transienter Virurie, wiesen Patienten mit persistierender Virurie eine signifikant höhere Viruslast im Urin auf ($p < 0,01$).

Interessanterweise ging die BK-Virurie stets einer BK-Virämie voraus: Ein Maximum der BK-Viruslast und der Anzahl viruspositiver Patienten zeigte sich im 3. Monat post transplantationem für die BK-Virurie und im 5. Monat für die BK-Virämie. Eine BKVAN wurde bei 21,4 % der Patienten mit persistierender BK-Virurie diagnostiziert und im Median 5 Wochen nach detektierter BK-Virämie und 11 Wochen nach BK-Virurie nachgewiesen.

Zusammenfassung: Der Nachweis der persistierenden BK-Virurie ist ein zuverlässiger Marker für die frühe Identifizierung von Hochrisikopatienten bezüglich der Entwicklung einer BKVAN und kann für eine frühzeitige therapeutische Intervention von großem Nutzen sein.

Abstract

Background: BK virus reactivation plays the causative role in the development of BKV associated nephropathy (BKVAN). Because of the lack of effective therapy, early diagnosis of BKV reactivation is paramount for the prevention of BKVAN. Resting in uroepithelial cells, BKV is excreted first in urine before it can be detected in plasma. The present study analyzed predictive value of BK viruria for the development of BK viremia and its possible advantage for the early BKVAN prediction.

Methods: Total of 4128 urine and serum samples obtained from renal transplant patients were analyzed for BKV positivity by real-time polymerase chain reaction. Altogether 433 patients were examined in a cross-sectional manner and 233 of these patients were selected for a prospective, longitudinal study. In this study, an average of 7 measurements per patient were recorded during the first year of post-transplantation.

Results: A total of 7% and 19% patients were positive for BKV in serum and urine, respectively. Sustained BK viruria showed sensitivity of 100% and specificity of 94% for BK viremia, and was associated with significantly higher level of BK load than the patients with transient viruria ($p < 0.01$). Interestingly, BK viremia was preceded by BK viruria: the peak of viral load and number of positive patients appeared during the third and fifth posttransplant month for urine and serum, respectively. BKVAN diagnosed in 21.4% of patient with persistent BK viruria, appeared 5 and 11 weeks after BKV reactivation in serum and urine respectively was detected.

Conclusion: Sustained BK viruria is a reliable marker allowing an early identification of patients at high risk of BKVAN development and therefore assure precocious therapeutic interventions.

1. Einleitung

1.1 Allgemeine Einführung

In der letzten Dekade hat sich die BK-Virusinfektion zu einer bedeutenden Komplikation bei nierentransplantierten Patienten entwickelt. Das humane Polyomavirus BK (=BKV) verursacht die sogenannte BK-Virus-assoziierte Nephropathie (=BKVAN), eine Komplikation die schätzungsweise 1 bis 10% der Nierentransplantierten betrifft und in bis zu 45% zu einem irreversiblen Transplantatverlust führen kann [Bonvoisin et al., 2008].

Das BK-Virus (B.K. = Initialen des ersten Patienten, bei dem das Polyomavirus hominis Typ 1 im Jahr 1971 erstmalig im Urin isoliert werden konnte) gehört zu der Familie der Polyomaviridae. Diese für den Menschen pathologischen Stämme, wurden bereits in den 70er Jahren identifiziert. Die Primärinfektion mit dem BK-Virus erfolgt zumeist inapparent im Kindesalter, die mit Beschwerden, ähnlich denen eines oberen Atemwegsinfektes, einhergehen kann [Knowles et al., 2003]. Das BK-Virus persistiert in den Zellen verschiedener Organe, insbesondere in den Epithelzellen des Urogenitaltraktes [Bonvoisin et al., 2008].

Durch eine Schwächung des Abwehrsystems kann es zu einer Reaktivierung des latenten Erregers und im Rahmen einer Sekundärinfektion zur Nephropathie oder hämorrhagischen Zystitis kommen.

Ungefähr 80% der erwachsenen Bevölkerung weltweit sind BK-Virus seropositiv [Stolt et al., 2004, Bonvoisin et al., 2008].

Eine asymptomatische, selbst limitierende BKV- Reaktivierung tritt auch bei dem immunkompetenten Bevölkerungsanteil in Form einer vorübergehenden BK-Virurie von schätzungsweise 15% auf [Hirsch et al., 2003c, Polo et al., 2004].

Im Gegensatz dazu kann es bei nierentransplantierten Patienten bei Reaktivierung des insbesondere im Urothelgewebe persistierenden BK-Virus zu einer systemischen Ausbreitung des Erregers kommen (= BK-Virämie). Daraufhin besteht die Gefahr des Übergriffs der BK-Viren auf das Nierentransplantat mit anschließender tubulointerstitieller Nephritis, der BKVAN.

In der Pathogenese der BKVAN spielen die seit Mitte der 90er Jahre neu eingeführten Immunsuppressionsschemata, besonders die Triple Therapie, bei der ein Calcineurininhibitor, ein Mycophenololäure-Derivat oder Azathioprin und ein Kortikoid miteinander kombiniert werden, eine zentrale Rolle. Vor allem die hochdosierte Verwendung des Calcineurininhibitors Tacrolimus

und Mycophenolatmofetil bedingt mittlerweile ein 10-13x erhöhtes Risiko an einer BKVAN zu erkranken [Hirsch et al., 2003c, Mengel et al., 2003].

Aber auch andere Risikofaktoren, wie patientenspezifische Charakteristika (siehe 1.5.3) oder organspezifische Faktoren sind maßgeblich.

Um bei Anzeichen einer beginnenden BKVAN eine immunologische Kontrolle der BK-Virus-Vermehrung zu erzielen, muss die Immunsuppressionsdosis reduziert werden. Dies erhöht jedoch die Gefahr einer immunologischen Abstoßungsreaktion. Ein weiteres Problem stellt das Fehlen einer spezifischen antiviralen Therapie dar. In der Off-Label-Therapie konnten bisher Cidofovir und Leflunomid nur Teilerfolge vorweisen.

Aufgrund der Verbesserung diagnostischer Strategien und frühzeitiger Interventionen konnte die Zahl der Transplantatverluste nach BKV-Reaktivierung deutlich reduziert werden: Während bisherige Studien einen BKVAN bedingten Transplantatverlust von 47 bis 60% in den ersten 5 Jahren nach Transplantation beschrieben, können jüngste Studien nach Anwendung von frühzeitigen Screeningverfahren einen Rückgang des BKVAN assoziierten Transplantatverlustes auf 15 bis 30% verzeichnen [Brennan et al., 2005, Wadei et al., 2006].

Derzeitige Empfehlungen umfassen das Screening auf BKV-Reaktivierung mit nachfolgender präventiver Reduktion der Immunsuppression bei Patienten mit positivem BKV-Screeningergebnis [Brennan et al., 2005]. Unter den aktuell verfügbaren Methoden zur Diagnostik einer BKV-Infektion zeigte die Analyse der BKV-DNA im Serum die höchste Vorhersagekraft einer BKVAN (bei einer Viruslast im Plasma größer 10^4 Kopien/ml) [Hirsch, 2003b].

Almera et al. veröffentlichten in einer Studie von 2008, dass die Entstehung einer BKVAN mit Hilfe einer frühzeitigen Reduktion der Immunsuppression bei detektierter BK-Virämie bei 10 von 11 Patienten verhindert werden konnte [Alm eras et al., 2008]. Dennoch weisen die Autoren daraufhin, dass eine bereits eingetretene BKVAN nicht durch eine Verminderung der Immunsuppression in ihrer Progredienz aufgehalten werden kann. Diese Untersuchungsergebnisse heben die Notwendigkeit einer engmaschigen Verlaufskontrolle sowie die frühest mögliche Identifizierung einer BKV-Reaktivierung hervor.

Da die Urothelzellen die primäre Lokalisation latenter BK-Viren darstellen, ist folglich jede Art der Virusvermehrung mit anschließender Zellzerstörung zuerst im Urin nachweisbar. Übereinstimmend konnten vorangegangene Studien eine zuverlässige Korrelation zwischen BK-Virämie und BK-

Virurie demonstrieren. Es wurde vermutet, dass eine im Urin messbare BK-Virusreplikation stets einer BK-Virämie vorausgeht [Brennan et al., 2005, Hirsch et al., 2005b].

Bisher mangelt es noch an großangelegten prospektiven, randomisierten Studien zur näheren Betrachtung und Evaluierung von Infektionsverlaufs- und Therapiemechanismen der BKV-Infektion bzw. BKVAN. Ziel dieser Studie ist die genauere Darstellung der Kinetik der BK-Viruslast.

Durch eine umfangreich angelegte prospektive Längsschnittuntersuchung über die BK-Virurie, BK-Virämie und die BKVAN bei nierentransplantierten Patienten soll der chronologische Verlauf der BKV-Infektion bis hin zu einer möglichen Entwicklung einer BKV assoziierten Nephropathie analysiert werden.

1.2 Polyomaviridae

Unter den Wirbeltieren finden Polyomaviren eine weite Verbreitung und treten durch ihre hohe Wirtsspezifität hervor.

Der Mensch dient als natürliches Reservoir für zwei Polyomavirusstämme, Polyomavirus hominis Typ 1 (=BK-Virus) und Polyomavirus hominis Typ 2 (=JC-Virus). Beide Virusgruppen tragen die Initialen derjenigen Patienten, bei denen sie 1971 erstmalig erfolgreich isoliert worden sind [Knowles et al., 2003].

Die dauerhafte evolutionäre Anpassung dieser jahrtausende alten, ubiquitären Viren an den menschlichen Wirt konnte nur durch eine hohe Bevölkerungsdurchseuchung bei gleichzeitig geringer Pathogenität gewährleistet werden.

80% der adulten Bevölkerung weltweit sind serumpositiv für beide Polyomaviren [Knowles et al., 2003].

Es lässt sich somit annehmen, dass diese Population bereits in ihrer Kindheit zum Beispiel nach Übertragung im familiären Umfeld eine Primärinfektion, vermutlich durch familiäre Übertragung, durchgemacht hat. Meist verläuft der erste Kontakt mit dem Virus asymptomatisch oder zeichnet sich nur als milder oberer Atemwegsinfekt ab, so dass keine besonderen Charakteristika für den Ablauf einer solchen Infektion bekannt sind [Stolt et al., 2004, Bonvoisin et al., 2008].

Nach stattgehabter Primärinfektion verbleibt das Virus lebenslang im menschlichen Organismus und siedelt sich in den Zielorganen an. Das BK-Virus befindet sich im Nieren- und harnableitenden Epithel und das JC-Virus im Nierengewebe und Knochenmark. Das JC-Virus kann bei HIV-Patienten im Stadium C3 und Knochenmarkstransplantierten, d.h. bei schwer immungeschwächten Patienten, eine meist tödlich verlaufende Erkrankung des zentralen Nervensystems hervorrufen (PML = progressive multifokale Leukoenzephalopathie) [Hirsch et al., 2004].

Das BK-Virus hingegen, kann durch Reaktivierung bei nierentransplantierten Patienten zu tubulointerstitiellen Nephritiden/ BKVAN und, bei fortschreitendem Befall, zum Transplantatverlust führen.

Das BK-Virus ist ein kleiner ($\emptyset = 45-50$ nm), hüllenloser Erreger mit einer zirkulären, doppelsträngigen DNA. Drei Strukturproteine VP1, VP2 und VP3 dienen der Formgebung und Stabilisierung, wobei VP1 hauptsächlich das Kapsid bildet und die Rezeptorbindung an die Wirtszelle vermittelt. Auch regulatorische Proteine (small T- und large T-Antigen) werden vom

Virusgenom kodiert. Mit Hilfe des Replikationsprogrammes der Wirtszelle erfolgt die Vermehrung des BK-Virus, welches anschließend durch Zelllyse freigesetzt wird [Knowles et al., 2003].

1.3 BK-Virus - klinische Manifestationsformen

Wie bereits im Punkt 1.2 erwähnt, liegt die Ursache einer Reaktivierung des im Urothelgewebe lokalisierten BK-Virus in einer Schwächung des Immunsystems. Bei nieren- oder knochenmarkstransplantierten Patienten wird eine Unterdrückung der Immunreaktionen auf medikamentösem Wege hervorgerufen, um eine akute Rejektion des Transplantates zu verhindern. Insbesondere die Verwendung neuer potenterer Immunsuppressiva wie Tacrolimus und Mycophenolatmofetil und deren Kombination erhöhen das Risiko für eine Infektion mit dem BK-Virus [Mengel et al., 2003].

Einen schweren Immundefekt erleiden auch HIV-Patienten im fortgeschrittenen Stadium durch das kontinuierliche Absinken der CD4-T-Helferzellzahl und sind damit ebenso für die Ausbildung einer BKV-Infektion prädestiniert [Hirsch et al., 2002b].

Abbildung 1:

BK-virusassoziierte Erkrankungen bei Immunkompromittierten:

- Ureterstenosen
- Ulcerationen des Urothels
- tubulointerstitielle Nephritis/ Nephropathie (=BKVAN)
- hämorrhagische Cystitis (insbesondere nach Knochenmark-TX)

Ramos et al., 2002

1.4 Besondere Charakteristika der BK-Virus-Infektion

Sowohl das klinische Bild als auch der Umfang der Erkrankung kann sich beim einzelnen Nierentransplantierten mannigfaltig gestalten. Folgende Schweregrade sind zu unterscheiden, auch wenn Abgrenzungen des Öfteren kompliziert sind [Hoischen, 2007].

1. BKV- Infektion

Anhand von serologischen Markern (Virus-DNA, Antikörper), kann nachgewiesen werden, ob ein Viruskontakt besteht oder bestanden hat. Dies findet mit Hilfe der PCR-Methode aus Patientenseren statt, durch welche sich auch Aussagen über die Replikationsaktivität des Virus treffen lassen [Hoischen, 2007].

2. BK - Replikation

Sobald sich das Virus vermehrt, treten erste Hinweise auf Zellzerstörungen auf (= lytische Infektion), die mikroskopisch durch sogenannte Decoy-Zellen im Urinsediment oder histologisch nachgewiesen werden können. Als Decoy-Zellen werden uretheliale Zellen mit viralen Einschlusskörpern bezeichnet, die aufgrund ihrer verwechselbaren Ähnlichkeit mit atypischen Zellen den Namen „Lockvogelzellen“ tragen [Hoischen, 2007].

3. BKV – Erkrankung

Die fortgeschrittene Gewebsschädigung durch Zellyse, die über eine Funktionsbeeinträchtigung der Niere bis hin zum Verlust des Transplantates führen kann, ist als BKVAN beschrieben und macht die histologische Sicherung durch Nierenbiopsie (Goldstandard) erforderlich [Hoischen, 2007].

1.5 Grundlagen der BKVAN

1.5.1 Epidemiologie

In der letzten Dekade hat die Rate an BKVAN, bedingt durch potentere Immunsuppressionsregime, drastisch zugenommen. Innerhalb der ersten 2 Jahre nach Nierentransplantation zählt die BKVAN inzwischen zu den häufigsten Ursachen für einen Transplantatverlust [Hirsch et al., 2003c].

Die BKV-Infektionsrate von Nierentransplantierten beträgt 10 - 60%, wobei es sich primär um die Reaktivierung einer latenten Infektion handelt. Aber auch BKV-serumnegative Empfänger können durch Transplantation einer BKV-serumpositiven Spenderniere (Virusübertragung) eine Primärinfektion erleiden [Pang et al., 2007].

Die mittlere Zeitdauer bis zum Auftreten einer BKVAN liegt bei einem Jahr, woraufhin es in 15 - 60% der Fälle in den folgenden 5 Jahren zum Transplantatversagen kommt [Lienkamp et al., 2008, Brennan et al., 2005, Wadei et al., 2006].

1.5.2 Entstehung der BKVAN

Wie es von der BKV-Infektion zur BKVAN kommt, konnte bis heute noch nicht abschließend aufgeklärt werden. Bei Patienten, die zuvor noch keinen Kontakt mit dem BK-Virus aufwiesen (= serumnegativ), könnte ein seropositives Spenderorgan die Ursache für eine Virusübertragung darstellen [Smith et al., 2004]. Jedoch wurde die genaue Relevanz des BKV-Serostatus für den Empfänger noch nicht hinreichend untersucht.

Viel häufiger findet nach der Transplantation eine Reaktivierung der latenten BKV-Infektion statt, da das Virus nicht nur in der Niere, sondern ebenso in der Mukosa von Urether und Harnblase persistiert. Der Mechanismus der BKV-Reaktivierung und die anschließende Besiedlung der Tubulusepithelzellen des Transplantates sind noch nicht ausreichend aufgeklärt. Derzeit ist bekannt, dass bei autologen Transplantationen nur sehr selten eine BKVAN detektiert wird. So wurden als Risikofaktoren nicht nur die verstärkte Immunsuppression, sondern auch organspezifische Faktoren (z.B. Reperfusionsschäden) und patientenspezifische Eigenschaften (z.B. männlich, höheres Alter) mit einbezogen [Beimler, 2008].

Das BKV-Immunglobulin G (IgG) scheint eine Sekundärinfektion zu erschweren, denn seronegative Patienten haben ein erhöhtes Risiko für eine BKV-Replikation und BKVAN. Doch einen absoluten Schutz vor der BKVAN kann die Antikörper-vermittelte Immunität nicht

gewährleisten. Es wird vermutet, dass neben der humoralen auch die zelluläre Abwehr eine wesentliche Rolle spielt [Beimler, 2008].

Medikamentöse Immunsuppression und vorangegangene Abstoßungsreaktionen erhöhen das Risiko für eine BKVAN signifikant [Hirsch et al., 2002b].

1.5.3 Risikofaktoren

Einen wichtigen Risikofaktor stellt die Immunsuppression nierentransplantierter Patienten dar.

In der Studie von Helderman et al. konnte belegt werden, dass die vermehrte Nutzung potenterer Immunsuppressiva mit einer Zunahme der BKVAN korreliert [Helderman et al., 2003].

Laut einer Studie von Hirsch et al. haben 90% der BKVAN - Patienten eine Triple - Therapie, basierend auf Tacrolimus oder Mycophenolatmofetil und in mehr als 50% sogar deren Kombination, erhalten [Hirsch et al., 2003c].

Steroide erhöhen ebenso das Risiko für eine BKV-Replikation, ob angewendet in einer Triple-Therapie oder als intravenöse Bolusgabe im Rahmen der Rejektionsbehandlung [Binet et al., 1999, Celik et al., 2003, Hirsch et al., 2002b].

Auch andere Immunsuppressiva können zu einer Virusreplikation führen [Hirsch, 2002a]. Die Resultate einzelner Studien sind teilweise widersprüchlich [Hirsch et al., 2005a].

Darüber hinaus stellen folgende patientenspezifische Charakteristika ein erhöhtes Risiko für die BKV-assozierte Nephropathie dar: männliches Geschlecht, erhöhtes Alter (>50), weiße Hautfarbe, Diabetes mellitus als Co-Morbidität, ein verringerter BKV-Antikörpertiter (< 1:40) und eine Cytomegalievirusinfektion [Barri et al., 2001, Ramos et al., 2002, Ginevri et al., 2003, Trofe et al., 2003].

Nicht zuletzt spielen die Eigenschaften des Spenderorgans (z.B. immunologische Vorschädigungen durch vorangegangene akute Rejektionen) bei der Genese der BKVAN eine bedeutende Rolle.

Zudem werden eine starke Häufung von HLA-Inkompatibilitäten (= HLA-Mismatch) als relevanter Faktor für ein gesteigertes BKVAN- Risiko diskutiert [Hirsch et al., 2002b].

1.5.4 Klinische Präsentation und Diagnostik

Die BK-Virus-assoziierte-Nephritis (BKVAN) weist nur unspezifische klinische Symptome auf. Zumeist präsentiert sie sich als interstitielle Nephritis mit Erhöhung des Serum- Kreatinins. Wichtig ist hierbei die Differenzialdiagnose einer akuten Abstoßungsreaktion, da das Therapieregime bezüglich der Immunsuppression entgegengesetzt verläuft.

Die eindeutige Sicherung der Diagnose erfolgt mit Hilfe der Nierenbiopsie.

Ein Charakteristikum der BKVAN ist die pathologische Veränderung des Tubulusepithels des Nierenparenchyms und die Störung der Integration von urothelialen Basalmembranen. Die virusinfizierten Zellen zeichnen sich durch einen vergrößerten Zellkern und basophile, intranukleäre, virale Einschlusskörperchen aus. Immunohistologisch lässt sich SV40-T-Antigen nachweisen. Dieses identifiziert das Virus als „polyomastämmig“. Um eine genauere Klassifikation der BKV-Infektion zu erhalten, können BKV-spezifische Antikörper, Verfahren der *in situ* Hybridisierung oder *in situ* PCR genutzt werden [Randhwa et al., 1999].

Bei einer BKV-Erkrankung entzünden sich zunächst die virusinfizierten Gewebereiche der Nierenrinde und Medulla. Sie werden im weiteren Verlauf nekrotisch. Anschließend Vernarbungsprozesse führen zu tubulo-interstitiellen Atrophien und Fibrosierungen und daraus resultierenden Funktionseinschränkungen bis hin zum Verlust des Transplantates.

Aufgrund dieser unspezifischen histologischen Veränderungen einer BKVAN, die auch bei anderen pathologischen Nierenveränderungen (z.B. akute Rejektion) auftreten, muss der Schwerpunkt auf den Nachweis der reaktivierten BK-Viren gelegt werden. Es sollten stets mehrere Biopate der betroffenen Niere sowie zeitgleich Serum - und Urinproben des Patienten auf Virus-DNA untersucht werden [Drachenberg et al., 2006a].

Überblick – Diagnostischer Ablauf:

Patienten mit Anzeichen auf eine Virusreplikation, z.B. Decoy-Zellen oder erhöhte BKV-Viruslast im Urin werden als Risikopatienten für eine mögliche BKVAN (= possible PVAN) in Betracht gezogen. Daraufhin sollte nach BKV-DNA im Serum gesucht werden und bei vorhandener Virämie eine Quantifizierung stattfinden. Liegt die Viruslast über dem Grenzwert ($>10,000$ Kopien/ ml), wird dies als vermutliche BKVAN (= presumptive PVAN) definiert und erfordert gegebenenfalls eine Intervention durch Reduktion der Immunsuppression. Die Diagnosesicherung der definitiven BKVAN erfolgt letztendlich histologisch [Hirsch et al., 2004, Hirsch et al., 2005a].

Da die Diagnostik der BKVAN nicht aufgrund klinischer Standardparameter stattfindet und oft erst durch den Anstieg von renalen Retentionsparametern wie Serum - Kreatinin oder -Harnstoff an eine beginnende oder bereits bestehende Nierenerkrankung denken lässt, wurden verschiedene Richtlinien zum Screening entworfen. Derzeitige Empfehlungen von Hirsch et al. beinhalten die dreimonatliche Urinuntersuchung auf Decoy-Zellen sowie BKV-DNA innerhalb der ersten zwei Jahre nach der Nierentransplantation. Daraufhin soll bis zum Ablauf des 5. Jahres nach der Transplantation eine jährliche Untersuchung stattfinden [Hirsch et al., 2005a].

Positive Screeningergebnisse benötigen eine Bestätigung innerhalb von vier Wochen oder ergänzend einen quantitativen PCR-Test auf BKV-DNA im Serum. Die Schwellenwerte bei der real-time-PCR (rt-PCR) liegen im Urin bei $> 10^7$ Kopien BKV-DNA/ ml und im Serum bei $> 10^4$ Kopien BKV-DNA/ ml. Werden diese Werte überschritten, so ist die Biopsie zur histologischen Diagnosesicherung indiziert [Hirsch, 2003b].

Weiterhin soll auch bei Funktionseinschränkungen der Niere oder therapiebegleitend (= Verlaufskontrolle) die rt-PCR im Urin und Serum ihre Anwendung finden [Hirsch et al., 2005a].

1.5.5 Therapieoptionen

Aufgrund des Fehlens von prospektiven, randomisierten kontrollierten Studien konnte die Sicherheit und Wirksamkeit der wenigen Interventionsmöglichkeiten noch nicht ausreichend evaluiert werden, sodass die Evidenzsituation der Therapiemaßnahmen primär auf klinischen Erfahrungen und einzelnen Studien basiert.

Modifikation der Immunsuppression:

Zurzeit stellen die Reduzierung oder Umstellung der Immunsuppression die Mittel der ersten Wahl dar. Wie bereits beschrieben, wurde der Großteil der diagnostizierten BKVAN unter Anwendung der sogenannte Triple - Therapie beobachtet.

Eine Therapiemaßnahme besteht in der Dosisreduktion oder dem Absetzen einzelner Immunsuppressiva. Zu beachten ist bei der Modifikation der Immunsuppression, dass hierbei die Gefahr einer akuten Abstoßungsreaktion besteht.

Der Austausch einzelner Immunsuppressiva zählt bislang zu den häufigsten angewandten Maßnahmen. Zum Beispiel wurde unter dem Wechsel von Tacrolimus auf Cyclosporin A, oder von Mycophenolamofetil auf Leflunamide eine Regredienz der Virämie und Stabilisierung der BKVAN beobachtet [Trofe et al., 2002, Williams et al., 2005].

Durch das Aussetzen von Mycophenolamofetil bei früher Diagnostizierung einer BK-Virämie konnte eine BKVAN verhindert werden, ohne das dies mit einer signifikant erhöhten Rejektionshäufigkeit einherging [Brennan et al., 2005].

Die intensive Immunsuppression mit Hilfe von Antikörpern während der ersten 6-12 Wochen nach Transplantation (Induktionstherapie), zur Vermeidung einer frühen Abstoßung, stellt ebenfalls einen kritischen Aspekt dar. Das Risiko einer überdosierten Immunsuppression durch polyklonale Antikörper (z.B. Antithymozytäre-Antikörper) oder monoklonale Antikörper (z.B. Anti-IL-2-Rezeptor-Antikörper) mit anschließender Leukopenie und damit einhergehender erhöhter Virusinfektionsanfälligkeit muss von Patient zu Patient neu abgeschätzt werden und ist noch Gegenstand gegenwärtiger wissenschaftlicher Untersuchungen [Hoischen, 2007].

Die derzeitig fehlende antivirale Therapiemöglichkeit gegen BKV und die bisher eingeschränkten Therapieoptionen hinsichtlich der Immunsuppression machen die Notwendigkeit der Diagnostik einer BKV-Replikation oder BKVAN in der Frühphase deutlich. Denn bei einer bereits bestehenden Nierenfunktionsverschlechterung, die oft mit schweren histologischen Veränderungen einhergeht, ist eine Besserung der Transplantatfunktion kaum mehr zu erwarten. Lediglich die Stabilisierung des Transplantatzustandes konnte in dieser klinischen Situation erreicht werden [Ramos et al., 2002].

BKVAN versus akute Rejektion:

Eine komplizierte Situation entsteht bei der Behandlung einer diagnostizierten akuten Abstoßungsreaktion bei gleichzeitig bestehender BKVAN. Obwohl die BKVAN eher eine Komplikation der intensivierten Immunsuppression darstellt, kann gleichzeitig eine akute Abstoßungsreaktion auftreten. Sehr ähnliche histologische Merkmale wie inflammatorisches Zellinfiltrat und Tubulitis lassen nur schwer zwischen einer BKVAN und einer akuten Rejektion differenzieren. Außerdem kann eine akute Rejektion durch eine BKVAN getriggert werden [Hirsch et al., 2003c, Hirsch et al., 2006].

Das Therapieregime sieht deshalb bei gleichzeitig auftretender BKVAN und akuter Rejektion zuerst die Behandlung der Abstoßungsreaktion durch die intravenöse Gabe von Kortikoidsteroiden vor [Binet et al., 1999, Randhwa et al., 1999, Hirsch et al., 2002b]. Eine Senkung der Immunsuppressivadosis zur Behandlung der BKVAN kann anschließend erwogen werden. Serum-Kreatinin und BK-Virämie dienen beim "zweiphasigen Vorgehen" als Verlaufsparemeter [Hirsch et al., 2002b].

Auch hieraus wird deutlich, dass in dieser klinischen Situation die frühestmögliche, sichere Diagnostik eine wesentliche Voraussetzung für die Steuerung einer erfolgreichen Intervention darstellt.

„Off-label-use“ von Cidofovir:

Für Patienten, bei denen sich durch eine Modifikation der Immunsuppression keine Besserung der Transplantatfunktion einstellt, besteht die Möglichkeit einer Behandlung mit dem Virostatikum Cidofovir. Das Nukleosid-Analogon hemmt die virale DNA-Polymerase und ist für die intravenöse Therapie der CMV-Retinitis bei AIDS-Patienten zugelassen. Bekannt ist, dass Cidofovir in vitro in gemäßigter Form humane Polyomaviren hemmt. Weiterhin wurde ein Rückgang der BK-Virämie festgestellt [Farasati et al., 2005, Beimler, 2008]. Aufgrund fehlender prospektiver kontrollierter Studien zum Einsatz von Cidofovir und unter Berücksichtigung der bekannten Nephrotoxizität des Virostatikums wird es in der klinischen Routine bisher eher zurückhaltend eingesetzt [Beimler, 2008].

1.5.6 Prognose der BKVAN

Der Verlauf einer BKV- assoziierten- Nephropathie hat eine schlechte Prognose. Je früher eine BKV-Replikation diagnostiziert wird, umso höher ist die Chance auf einen Funktionserhalt des Transplantates und desto günstiger die Prognose [Lienkamp et al., 2008].

Aufgrund der Verbesserung diagnostischer Strategien konnten kürzlich publizierte Studien nach Anwendung von frühzeitigen Screeningverfahren einen Rückgang des BKVAN assoziierten Transplantatverlustes von 47 - 60% auf 15 - 30% in den ersten 5 Jahren post transplantationem verzeichnen [Brennan et al., 2005, Wadei et al., 2006].

1.5.7 Erneute Transplantation nach BKVAN?

Die Anzahl von Patienten mit durchgeführter Retransplantation nach Organverlust durch BKVAN ist sehr begrenzt. Dennoch scheint eine erneute Transplantation erfolgversprechend. Nach aktuellen Empfehlungen stellt der BKVAN- assoziierte Transplantatverlust keine Kontraindikation für eine erneute Transplantation dar. Jedoch sollte zuvor ein Screening des Patientenurins und -serums auf BKV erfolgen. Patienten mit persistierender BKV-Replikation haben ein erhöhtes Risiko für eine erneute BKVAN des nächsten Transplantates. Bei diesen Patienten sollte - wenn möglich - eine schonendere Immunsuppression zur Anwendung kommen [Hirsch et al., 2006, Beimler, 2008].

1.6 Fragestellung:

Eine bereits eingetretene und persistierende BKVAN kann bis zu 75 % der betroffenen Transplantate irreversibel schädigen. Die frühzeitige Identifizierung einer BKV-Reaktivierung und anschließende Intervention - insbesondere aufgrund der fehlenden antiviralen Therapie - gilt heute als die einzige Option BKV-Infektion-assoziierte Transplantatverluste zu vermeiden. Aus diesem Grund wird aktuell der Fokus auf eine effiziente Screeninguntersuchung von de novo Nierentransplantierten gelegt. Die genaue Kinetik der BKV-Reaktivierung im Urin und Serum wurde jedoch bis jetzt nicht ausreichend untersucht.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Wie ist die Prävalenz einer BK-Virurie/ -Virämie bei de novo Nierentransplantierten?
2. Wie stellt sich die Kinetik der BK-Virurie in der NTX-Population dar und gibt es Unterschiede im prädiktiven Wert bzw. in der Höhe der Viruslast bei Patienten mit unterschiedlichem klinischen Verlauf einer BK-Virurie (transiente versus persistierende BK-Virurie)?
3. Bringt die Untersuchung der BK-Viruslast im Urin einen zeitlichen Vorteil für die Diagnostik einer BKV-Reaktivierung und kann sie somit als relevanter Screeningparameter für eine BK-Virämie oder BKVAN genutzt werden?
4. Stellt die Modifizierung/Reduktion der Immunsuppression bei Patienten mit persistierender BK-Virämie/-Virurie eine sichere und effektive therapeutische Maßnahme dar?

2. Material und Methoden

Experimenteller Teil

2.1 Tabelle 1: Apparative Ausstattung

Folgende technischen Hilfsmittel bzw. Verbrauchsmaterialien wurden für die Aufbereitung der Urin- und Serumproben sowie für die anschließende Durchführung der quantitativen Real-Time-PCR verwendet:

Gerät	Firma	Herkunft	Bezeichnung
Taq-Man	Applied Biosystems	Darmstadt	7500 Real Time PCR-System
Thermoblock	Eppendorf	Hamburg	Thermomixer compact
Thermoblock	Eppendorf	Hamburg	Thermomixer 5436
Schüttelgerät/ Vortexer	IKA	Wilmington, U.S.A.	MS2 Minishaker
Schüttelgerät/ Vortexer	Scientific Industries, Inc.	Bohemia, U.S.A.	VORTEX-GENIE 2
Zentrifuge	Heraeus	Osterode	Biofuge fresco
Zentrifuge	Jouan	De Brais, Frankreich	BR. 311
UV-Lichtkabinett	Oncor	Gaithersburg, U.S.A.	Template Tamer
Pipetten	Eppendorf Research	Hamburg	Research
Pipetten	Eppendorf	Hamburg	Reference
Pipettenspitzen	Biozym	Oltendorf	SafeSeal-Tips 10µl
Pipettenspitzen	Biozym	Oltendorf	SafeSeal-Tips 1000µl

Gel-Monovette (Blut)	Sarstedt	Nümbrecht	Sarstedt S-Monovette, braun (Serum-Gel) 7,5 ml
Urin-Monovette (unsteril)	Sarstedt	Nümbrecht	Sarstedt Urin-Monovette, gelb, 10ml
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One	Solingen	Filter Tipp FT 100µl
Eppendorfgefäße	Original Eppendorf	Hamburg	Safe-Lock Tubes 0,5ml
Eppendorfgefäße	Original Eppendorf	Hamburg	Safe-Lock Tubes 1,5ml
Eppendorfgefäße	Original Eppendorf	Hamburg	Safe-Lock Tubes 2ml
Säule (Eppendorf- gefäße mit Filter)	Qiagen	Hilden, Germany	QIAamp Spin Column 2ml
Collection Tubes	Qiagen	Hilden, Germany	
Optical Tubes	Applied Biosystems	U.S.A.	MicroAmp optical tubes 0,2ml
Optical Caps	Applied Biosystems	U.S.A.	MicroAmp optical caps

2.2 Tabelle 2: Reagenzien/ Chemikalien

TAQMAN Universal PCR Master Mix	5ml (Applied Biosystems, New Jersey)
Ethanol Absolute	46,07g/mol (J.T.Baker, Deventer, Holland)
Ampuwa (Aqua dest.)	steriles, pyogenfreies Wasser (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Germany)
Dekontaminationsmittel	RNase Away (Molecular BioProducts, San Diego, Mexico)

PBS-Puffer (Dulbecco`s PBS) ohne Ca und Mg	pH 7.19-7.59, Osmolarität 280-286 mOsm, (PAA laboratories GmbH, Pasching, Germany)
Polyomavirus-VP1-Sonde (Eurogentec)	Polyomavirus-VP1 probe FAM 5-CAG-CTC-TGG-ACC-ACA-ACA-GTG-GAG-AGG-C-3
Polyomavirus-Primer (Metabion)	1. Polyomavirus-VP1 forward 5-TGC-TGA-TAT-TTG-TGG-CCT-GTT-TAC-T-3 2. Polyomavirus-VP1 revers 5-AGG-CGG-ATC-TTA-AAA-TAT-CTT-GCA-3
Polyomaplasmid –Referenzprobe	Konsiliarlabor für Polyomaviren, Institut für Virologie und Immunbiologie, Universität Würzburg
Humanes AB-Serum	PAA, Pasching, Österreich

2.3 Tabelle 3: QIAamp Ultra Sens Virus Kit (250):

(Firma: Qiagen, Hilden, Germany)

Buffer AB (22ml concentrate)	binding buffer
Buffer AC	viruslyse + concentrating buffer
Buffer AR (90ml)	resuspension buffer
Buffer AVE (2ml)	0.04% sodium azide (RNase free)
Buffer AWI	wash buffer 1
Buffer AW2	wash buffer 2
Carrier RNA (310µg)	improve precipitation of DNA

Proteinkinase K Solution (6ml)	Endopeptidase
--------------------------------	---------------

2.4 Proben:

Innerhalb eines Zeitraumes von 45 Monaten (01/03 bis 09/06) wurden insgesamt 4128 Urin- und Serumproben von 433 nierentransplantierten Patienten mit Hilfe der Methode der real-time-PCR auf BKV-DNA untersucht.

Alle Proben wurden von der nephrologischen Ambulanz, Station, Intensivstation des Virchowklinikums Charité bezogen.

Die einmalige Entnahme einer Serum- und Urinprobe von Patienten für die Querschnittsuntersuchung fand während der routinemäßigen ambulanten Nachkontrolle statt.

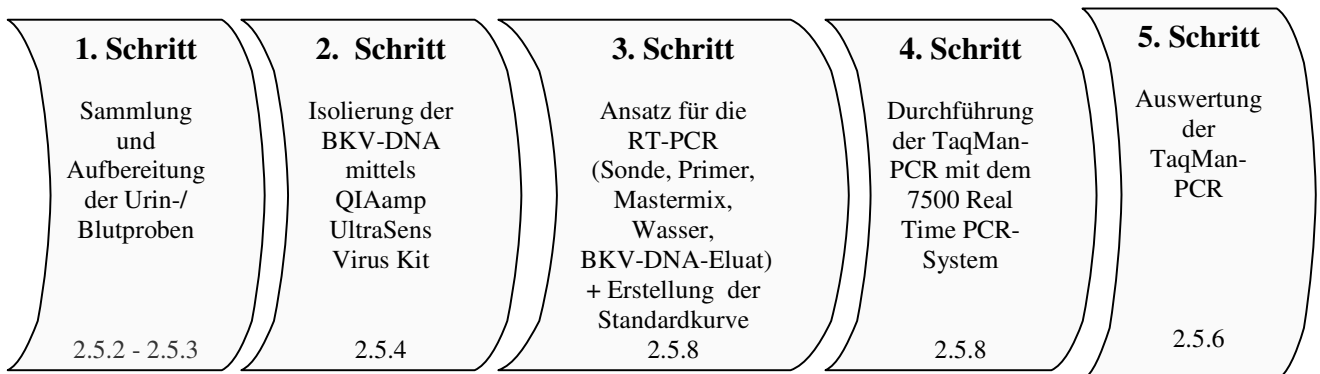
Die Anzahl der BKV-DNA Kopien wurde mit Hilfe der Taqman Real-Time PCR gemessen, wie nachfolgend beschrieben.

2.5 Laborablauf:

2.5.1 Sicherheitsvorkehrungen

Bei der PCR entsteht eine hohe Kopienzahl an Reaktionsprodukten, die die Gefahr der Kontamination in sich birgt. Um dieses Risiko zu minimieren, wurden räumliche Trennungen zwischen der DNA-Präparation, der Herstellung des PCR-Ansatzes und der Erstellung der Standardkurve eingerichtet. Bei jedem Versuch wurde eine Negativkontrolle (AB-Serum) mitgeführt, um falsch positive Ergebnisse durch eine mögliche Kontamination auszuschließen. Des Weiteren wurden stets Pipettenaufsätze (DNase-, RNase- und pyrogenfrei) mit integriertem Filter verwendet, puderfreie Latexhandschuhe getragen und bei Verdacht auf Verunreinigung Geräte und Arbeitsflächen mit einem Dekontaminationsmittel (RNase away) gereinigt.

In einem Zeitraum von 30 Minuten befanden sich die Pipetten vor Arbeitsbeginn im UV-Lichtkabinett.

Abbildung 2: Übersicht Arbeitsschritte

2.5.2 Aufbereitung des Blutes

Die venöse Blutentnahme erfolgte mit 7,5 ml Gel-Monovetten. Das Blut wurde 10 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert und der Überstand (Serum) in ein 2ml Eppendorfgefäß abpipettiert um ihn dann bei 4°C zwischenzulagern bzw. bei -20°C für längere Zeit aufzubewahren.

2.5.3 Aufbereitung des Urins

Gesammelt wurden circa 5-10ml Morgenurin pro Patient in Urin-Monovetten ohne Stabilisator. Bei sofortiger Weiterverarbeitung erfolgte die Zwischenlagerung in 2ml Eppendorfgefäßen bei 4°C, sonst wurden die Proben bei -20°C aufbewahrt.

Bei Lagerung im Gefrierschrank galt es die in den Reagenzgläsern befindlichen Urinproben aufzutauen (circa 1 Stunde bei Raumtemperatur). Vorsichtiges Schwenken diente der Verhinderung einer Sedimentablagerung. Die Umlagerung der Urinproben in jeweils 2ml Eppendorfgefäße gewährte bessere Lagerung und Weiterverarbeitung.

Zusätzlich konnten stets 10 Patientenproben, die im Serum BK-Virus negativ gemessen wurden, für einen so genannten Pool verwendet werden, d.h. je 100µl Urin pro Patient wurden zu 1ml Gesamtprobe vermischt und in ein 2ml Eppendorfgefäß gefüllt. Diese Pools wurden ebenso wie Einzelurin- bzw. Einzelblutproben weiterverarbeitet und gemessen. Bei nachgewiesener BK-Viruslast in dieser Poolprobe, wurden die betroffenen 10 Patientenproben nochmals einzeln präpariert und per TaqMan-PCR gemessen.

2.5.4 Gemeinsame Schritte der Weiterverarbeitung

2.5.4.1 DNA- Präparation mittels QIAamp UltraSens Virus Kit (250)

Sowohl die Blut-Lysate, als auch die Urin-Lysate wurden zunächst langsam auf Raumtemperatur (15-25°C) erwärmt. Das verwendete Probevolumen betrug beim Urin 1ml und beim gewonnenen Serum 200µl. Letzteres wurde daraufhin mit 800µl PBS – Puffer aufgefüllt, um ein gleiches Ausgangsvolumen (1ml) für die gemeinsame Weiterverarbeitung zu gewährleisten.

Die Negativkontrolle setzte sich, anstelle des Probematerials, aus 1ml Polyomavirus-negatives AB-Serum zusammen.

Die Positivkontrolle enthielt BK-Virusplasmid. Die Polyomaplasmid-Referenzprobe entstammt dem Konsiliarlabor für Polyomaviren des Instituts für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg. Die Verdünnung für die Positivkontrolle erfolgte 1:50, d.h. zu 20µl Virusflüssigkeit wurden 980µl PBS – Puffer gegeben.

Zusätzlich wurde zur Qualitätssicherung eine Low-Positivkontrolle mitgeführt, sodass auch niedrigere „Positivbereiche“ erfasst werden konnten. Hier erfolgte die Verdünnung der bereits erstellten Positivkontrolle 1:10, d.h. zu 2µl Positivkontrolle wurden 18µl destilliertes Wasser hinzupipettiert.

Folgende Schritte wurden nun mit jeder Urin- und Serumprobe sowie der Kontrollprobe durchgeführt:

Zunächst erfolgte die Zugabe von 800µl Puffer AC auf die Probe und das Pipettieren von 5,6µl carrier RNA in den Eppendorfgefäßdeckel, um eine direkte Vermischung beider Reagenzien zu vermeiden (Gefahr der RNA-Stabilisierung/ Vermehrung). Anschließend konnte das Eppendorfgefäß verschlossen, vorsichtig 3-4mal geschwenkt, 10 Sekunden mit Hilfe des Minishakers geschüttelt werden. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte eine dreiminütige Zentrifugation der Probe bei 4000 rpm. Der Überstand wurde dekantiert. Es fand die Auflösung des verbliebenen Pellet mit 300µl des auf 60°C erwärmten AR-Puffer statt. Des Weiteren wurde Proteinkinase K zugefügt. Der Aktivitätsbereich dieses Enzyms liegt bei 40-60°C.

Nach 15 Sekunden vortexen sollte sich das Pellet vollständig gelöst haben. Der Thermoblock mit Schüttelfunktion sorgte bei 40°C und 1400 rpm für eine zehnminütige Inkubation der Probe. Um

eventuelle Kontaminationen beim Öffnen der Eppendorfgläser (durch Probentropfen an der Deckelinnenseite) zu vermeiden wurde die Probe bei 2000 rpm zentrifugiert.

Nachfolgende Schritte dienen der Waschung/ Elution der Proben, um ein Herauslösen/ Isolieren vorhandener BKV-DNA zu erzielen:

Zunächst wurden 300µl AB-Puffer zur Probe hinzugefügt, welche anschließend 5 Sekunden gevortext und erneut bei 2000 rpm zentrifugiert wurde. Das entstandene 700µl Lysat musste nun vorsichtig auf die QIAamp – Säule (Eppendorfglas mit Filter) überführt und für 1 Minute bei 4000 rpm zentrifugiert werden. Der Überstand wurde verworfen und das Eppendorfglas auf ein 2ml Collection Tube gesteckt. Es erfolgte die Zugabe von 500µl AW1 – Puffer, eine einminütige Zentrifugation bei 8000 rpm, der entstandene Überstand wurde erneut verworfen und das Eppendorfglas auf einen neuen Collection Tube gesteckt. Nach dem gleichen Verfahren fand die Zugabe von 500µl AW2-Puffer statt. Bei 3 Minuten und 13 000 rpm erfolgte das Zentrifugieren der Probe, der Überstand wurde verworfen und die Probe nochmals 2 Minuten bei 13 000 rpm zentrifugiert.

Die Säule konnte nun auf ein 1,5ml Eppendorfglas gesetzt und mit 60µl AVE- Puffer versehen werden um anschließend 5 Minuten bei Raumtemperatur zu inkubieren. Nach erneuter Zentrifugation (1 Minute bei 8000 rpm) konnte das gewonnene Eluat, sollte keine direkte Weiterverarbeitung erfolgen, bis zur Durchführung der PCR bei -20°C zwischengelagert werden.

2.5.5 Real-Time-PCR/ TaqMan-PCR

2.5.5.1 Vorwort

Der Grundstein für die quantitative Real-Time (Echtzeit)- PCR wurde 1992 durch HIGUCHI gelegt [Higuchi et al., 1992]. Das Verfahren basiert auf die in der Mitte der 80er Jahre entwickelte PCR-Reaktion, bei der mit Hilfe von Enzymen und spezifischen Primern kurze, genau definierte Teile eines DNA-Strangs in vitro vervielfältigt und somit detektiert werden können. Das Ausgangsmaterial, ein doppelsträngiges DNA-Stück, welches die erforderliche Zielsequenz aufweist und demzufolge als Matrize dient, wird zunächst durch Hitzezufuhr (95°C) in 2 Einzelstränge (Denaturierungsprozess) aufgetrennt. Im Annealing (Anlagerungs-)-Schritt wird der zu vervielfältigende Bereich von zwei Primern (Oligonukleotide) eingegrenzt und hybridisiert. Schließlich ergänzt die DNA-Polymerase die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden und die Zielsequenz wird verlängert (Elongation). Diese Schritte werden à 40 Zyklen wiederholt, sodass eine exponentielle Vermehrung der Zielsequenz erreicht wird.

Nach dem Ablauf der PCR kann nun die quantitative Auswertung mittels Agarose-Gelelektrophorese erfolgen.

Im Gegensatz zur herkömmlichen PCR mit anschließender Elektrophorese manifestiert sich hier der Vorteil der Real-Time-PCR (rt-PCR). Dieses Verfahren kombiniert die DNA-Vervielfältigung (PCR) mit dem quantitativen Nachweis des PCR-Produktes mittels Fluoreszenzmessung simultan (in „Echtzeit“) in einem einzigen Reaktionsgefäß. (siehe Abbildung 3)

Da nun eine gelektrophoretische Auftrennung nicht mehr nötig ist und die Daten sofort abrufbereit sind, erreicht dieses Verfahren eine hohe Zeitersparnis. Ebenso ist das Kontaminationsrisiko deutlich geringer, da die Reaktionen in verschlossenen Tubes ablaufen und nach dem Beginn der rt-PCR keine Pipettierschritte mehr notwendig sind.

2.5.5.2 Ablauf der Real-Time-PCR

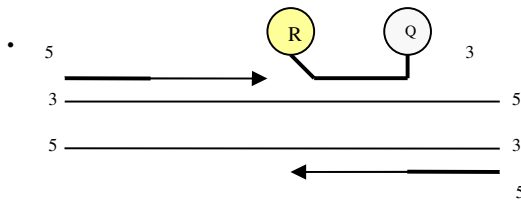
Wie bereits erwähnt, ermöglicht die Real-Time-PCR den Amplifikationsprozess an sich und die quantitative Auswertung des PCR-Produktes in „Echtzeit“.

Die für diese Studie angewendete TaqMan-PCR nutzt zusätzlich die 5`-3`-Exonukleasereaktivität der AmpliTaq-DNA-Polymerase, die der Erzeugung eines messbaren Signals während der PCR, dient. Hierfür wird eine sequenzspezifische Hybridisierungssonde verwendet, die an ihrem 3`- Ende über einen Quencher- Farbstoff (TAMRA™) und an ihrem 5`- Ende über einen Reporter-

Fluoreszenzfarbstoff (FAM) verfügt. Zusätzlich befindet sich ein Phosphatrest am 3'-Ende der Sonde, der die Extension des 3'-Endes während der PCR unterbindet. Die Fluoreszenzemissionen des Reporter-Farbstoffes werden bei intakter TaqMan-Sonde durch die Nähe des Quencher-Farbstoffes mit Hilfe des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Prinzip (FRET) verschluckt. Während des PCR- Zyklus bindet die Sonde an den denaturierten komplementären DNA-Strang. Die TaqMan-Polymerase trifft nun auf die Sonde, verdrängt jene und wird dadurch 5'-3'-Exonuklease-aktiv. Nach vollständiger PCR-Synthese kann nun die Polymerase die Sonde am 5'-Ende abbauen. Der Reporter-Farbstoff wird nun nicht mehr durch den Quencher unterbunden und emittiert bei Anregung detektierbare Fluoreszenz.

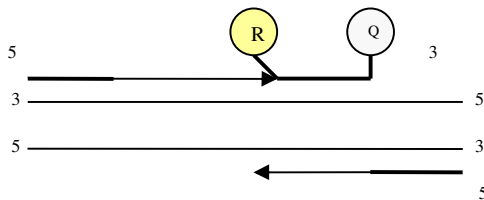
In Abhängigkeit von der Anzahl freigesetzter Moleküle entfaltet der Reporter-Farbstoff seine charakteristische Fluoreszenz. Der Anstieg der Reporterfluoreszenz wird nach jedem Zyklus gemessen und ist linear proportional zum entstehenden DNA-Amplifikat. Daraufhin kann die Ausgangsmenge des Templates errechnet werden (siehe 2.5.6). Die Ermittlung der Emissionsintensität erfolgt mit Hilfe eines Lasers (ABI PRISM), der bei einer Wellenlänge von 488nm die PCR-Synthese durchgehend erfasst, indem er die PCR-Reaktionsgefäße durchleuchtet. Um die Fluoreszenzänderung quantifizieren zu können, muss die Berechnung einer Standardkurve erfolgen.

Abbildung 3: Schematische Darstellung des Prinzips der TaqMan-PCR

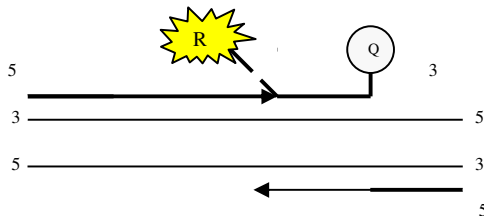


1. Polymerisationsphase:

Die TaqMan-Sonde trägt zwei Fluorochrome, den Reporterfarbstoff (R) am 5'-Ende und den Quencherfarbstoff (Q) am 3'-Ende. Solange die Sonde intakt ist, werden die Fluoreszenzemissionen des Reporter-Farbstoffes durch die Nähe des Quencher-Farbstoffes mit Hilfe des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Prinzip (FRET) gehemmt.

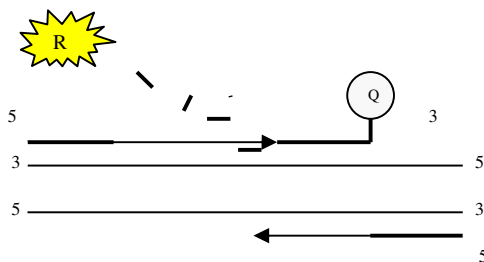


2. Strangverschiebung: Erreicht die TaqMan-Polymerase durch Strangverlängerung die Sonde, so entsteht eine Y-Gabelstruktur, wodurch die 5'-Nuklease-Aktivität der Polymerase aktiviert wird.



3. Elongationsphase:

Sobald die Polymerase nach abgeschlossener PCR-Synthese auf die TaqMan-Sonde trifft, wird sie hydrolysiert und der Reporterfarbstoff wird abgespalten.



4. vollendete Polymerisation:

Durch die Trennung des Reporterfarbstoffes vom Quencher, kann der Reporter nun bei Anregung detektierbare Fluoreszenz emittieren.



= gehemmter Reporterfarbstoff



= Quencher-Farbstoff



= fluoreszierender Reporterfarbstoff

2.5.6 Auswertung der TaqMan-PCR

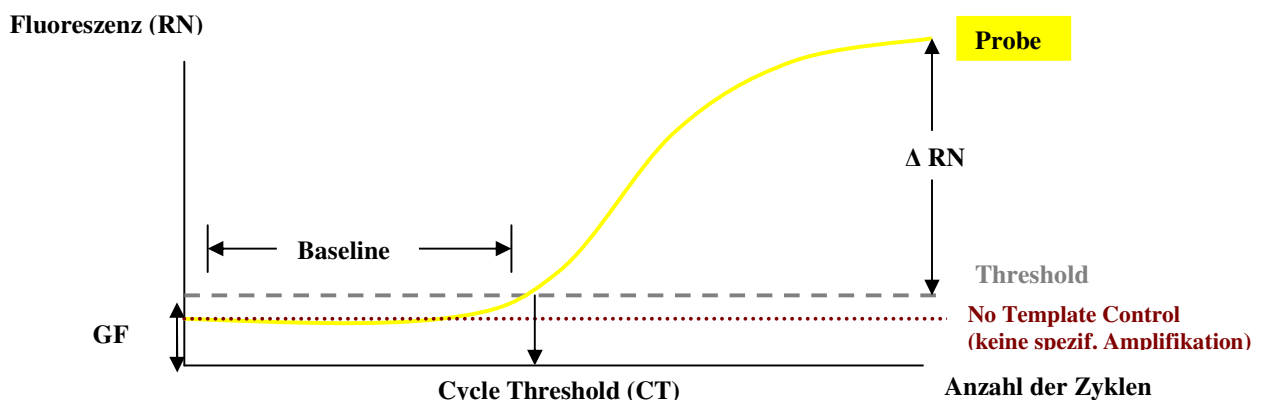
Zwei Schritte werden für die Auswertung benötigt. Zunächst muss die Baseline angeglichen werden, d.h. es wird der Bereich der initialen Zyklen mit Hintergrundrauschen manuell eingegeben. Daraufhin kann das TaqMan-Analyseprogramm (Sequenz Detektions System (SDS) mit Hilfe des in der Mastermixlösung enthaltenen passiven Referenzfarbstoffes (ROX) das Signalrauschen glätten und gerätebedingte Fehlmessungen durch Normaleinstellung auf den ROX-Farbstoff korrigieren.

Als 2. Schritt wird aus den gemessenen Fluoreszenzwerten eine sogenannte Amplifikationsgraphik erstellt, indem die Zyklenzahl auf die X-Achse und die ermittelte Fluoreszenz auf die Y-Achse aufgetragen wird. Die Fluoreszenzfarbstoffe weisen bereits vor Beginn der PCR eine Fluoreszenz (Grundfluoreszenz = GF) auf. Der Fluoreszenzwert liegt also nicht bei Null. Jedoch liegt er unter dem Threshold (Schwellenwert) und würde im Falle einer negativen rt-PCR (keine Virus-DNA vorhanden) mit gleicher Intensität, d.h. in einer Linie bis zum Ende der TaqMan-PCR weiterverlaufen. Bei einer positiven Reaktion hingegen steigt durch die Amplifikation des Produktes die Fluoreszenzstärke stetig an. Zunächst erhöht sie sich nur sehr langsam und verbleibt unterhalb des Schwellenwertes. In diesem Bereich (Baseline) findet bereits Synthese statt, es entstehen jedoch nur geringe Mengen des DNA-Produktes. Sobald die Fluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz und damit den Schwellenwert übersteigt, bildet sich ein Schnittpunkt zwischen Fluoreszenzachse und Schwellenwertgerade, der CT-Wert (Cycle-Threshold) entsteht. (siehe Abbildung 4)

Nun ist die Quantifizierung der Zyklen möglich, denn der CT-Wert verhält sich umgekehrt proportional zum Logarithmus der Ausgangsmenge an Virus-DNA [Higuchi et al., 1993].

Je geringer der CT-Wert, desto höher ist die Ausgangsmenge an Virus-DNA und umgekehrt.

Abbildung 4: Beispiel einer Amplifikationsgraphik



Da jedoch die Vermehrungsrate einer Reaktion nie konstant ist bzw. die Amplifikation der DNA-Fragmente durch verschiedene Faktoren bestimmt wird, ist es nicht möglich, allein anhand des CT-Wertes die ursprüngliche Matrizenmenge zu errechnen [Mengel et al., 2003].

Deswegen erfolgt die Auswertung durch die absolute Quantifizierung. Die dafür benötigte Standardkurve entsteht durch eine Verdünnungsreihe mit BKV-Plasmid, wie in Punkt 2.5.7 beschrieben.

Proben, die die Nachweisgrenze (= Treshold) übersteigen, wurden als positiv betrachtet. Die Nachweisgrenze stellt die niedrigste in einem linearen Bereich gemessene BK-Viruslast von 4500 DNA-Kopien/ ml dar. Als klinisch signifikant wurde in dieser Studie erst ein Anstieg der BK-Viruslast über einen Schwellenwert für Serum > 10.000 DNA-Kopien/ ml und Urin > 100.000.000 Kopien/ ml gewertet und erst dann wurde ein therapeutischer Interventionsbedarf gesehen.

2.5.7 Erstellung der Standardkurve

Mit Hilfe der Standardkurve kann eine absolute Quantifizierung der womöglich vorhandenen BKV-DNA erfolgen. Hierbei wurden, parallel zu der BKV-Gen-Analyse, sieben unterschiedliche Verdünnungen einer bekannten Menge Standard-DNA (es handelte sich dabei um BKV-Plasmid) gemessen. Da die Ausgangsmenge bekannt war, konnte die Standardkurve durch Auftragen des Logarithmus der Ausgangsmenge gegen den Cycle Threshold (CT) konstruiert werden. Die analysierten CT-Werte der zu untersuchenden Proben konnten anhand der Standardkurven umgerechnet werden. Die nun ermittelten Werte für BKV-DNA wurden ins Verhältnis zum Probevolumen gesetzt und ergaben den relativen Gehalt von BKV-DNA in Kopien/ μ l.

Verdünnungsreihe: 8000 Kopien/ μ l, 2000 Kopien/ μ l, 500 Kopien/ μ l, 125 Kopien/ μ l, 31,25 Kopien/ μ l, 15,62 Kopien/ μ l, 7,81 Kopien/ μ l

2.5.8 Ansatz und Durchführung der TaqMan (Real-Time)-PCR

Der PCR-Reaktionsansatz wies 25µl Gesamtvolumen auf und setzte sich aus folgenden Reagenzien zusammen:

Tabelle 4: PCR-Reaktionsansatz

Reagenzien	Endkonzentration	µl pro Ansatz
Polyoma-VP1 Primer-Mix	300/ 900nM	6
Polyoma-VP1 FAM-Sonde	5µM	1
Steriles deionisiertes Wasser	-	1
Taq-Man Master-Mix	1x	12,5
Zu bestimmende DNA-Eluate	-	4,5

2.5.8.1 Verwendete Primer und Sonden

Primer und Sonden wurden so konstruiert, dass sie die Virusprotein-1-Region (VP1-Region) des BK-Virus amplifizieren. Es wurde ein Standardplasmid verwendet, welches die VP1 kodierende Region beinhaltet und somit die Anzahl der BKV-DNA-Kopien pro Milliliter bestimmen kann.

Tabelle 5: Polyomavirus-Primer (Firma Metabion)

Polyomavirus-VP1 forward	5-TGC-TGA-TAT-TTG-TGG-CCT-GTT-TAC-T-3
Polyomavirus-VP1 reverse	5-AGG-CGG-ATC-TTA-AAA-TAT-CTT-GCA-3

Tabelle 6: Polyomavirus-VP1-Sonde (Firma Eurogentec)

Polyomavirus-VP1 probe FAM	5-CAG-CTC-TGG-ACC-ACA-ACA-GTG-GAG-AGG-C-3
-----------------------------------	--

2.5.8.2 TaqMan-Vorbereitungen:

Zunächst sollte die präparierte Proben-DNA bei Raumtemperatur aufgetaut, kurz gevortext und anschließend bei 2000 rpm zentrifugiert werden.

Jeweils 20,5µl Mastermix wurden in das Reaktionsgefäß einer Mikrotiterplatte (MicroAmp Optical 96-Well-Platte) pipettiert. Daraufhin konnte pro Reaktionsgefäß 4,5 µl Probenmaterial zugefügt werden, sodass ein Gesamtvolumen von 25µl entstand. Jede Probe wurde zur Kontrolle einer exakten Pipettierung zweifach gemessen. Zusätzlich wurden 2 Gefäße ohne DNA-Zugabe mitgeführt, um eventuelle Kontaminationen der Mastermixlösung auszuschließen. Anschließend erfolgte das Pipettieren der Verdünnungsreihe auf 14 mit Mastermix befüllte Reaktionsgefäße. Hier fand ebenso eine Doppelbestimmung der 7 Verdünnungen statt.

Optical caps dienen dem Verschluss der Mikrotiterplatte. Letztmalig wurde die Platte eine Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert, um möglichen Messfehlern durch an den Seitenwänden haftenden Probetropfen oder Luftbläschen vorzubeugen.

2.5.8.3 Durchführung der TaqMan-PCR

Die Durchführung der TaqMan-PCR mit dem 7500 Real Time PCR-System (Applied Biosystems) fand in folgenden Stufen statt:

Tabelle 7: Thermocyclerprogramm:

Stufe	Schritt	Zyklusanzahl	Temperatur	Dauer in Minuten
1	Aktivitätsbereich UNG- Enzym ^o	1	50°C	02:00
2	Aktivierung AmpliTaq Gold Enzym	1	95°C	10:00
3	Denaturierung	40	95°C	00:15
	Annealing/Extention		60°C	01:00

^oZur Vermeidung von „carry-over“ (Übertragungs)- Kontaminationen baut dieses Enzym kontaminierende Amplikons vor dem Beginn der PCR ab.

Klinischer Teil

2.6 Studienaufbau/ Studienpopulation:

Von insgesamt 1549 nierentransplantierten Patienten, die fortlaufend in den Ambulanzen des Campus Virchow-Klinikums betreut werden, erfolgte im Zeitraum Januar 2003 bis August 2006 die Rekrutierung von 433 transplantierten Patienten, von denen 233 de novo Nierentransplantierte für die prospektive Längsschnittstudie im Verlauf untersucht wurden.

Die Studie wurde von der Ethik-Kommission des Universitätsklinikums Charité Berlin genehmigt. Alle Patienten unterzeichneten vor Aufnahme in die Studie eine Einverständniserklärung.

2.7 Histologische Untersuchungsbefunde und Diagnose der BKVAN

Die klinische Diagnose der BKVAN, die sich durch erhöhte Nierenretentionsparameter und BK-Viruslast äußert, wurde nach Gewinnung eines Nierenbiopates durch typische, histologische Charakteristika bestätigt. Eine diagnostische Biopsie des Transplantates fand bei jedem Patienten statt, der einen erhöhten Kreatininwert und einen Anstieg der BK-Viruslast im Serum aufwies.

Wie bereits unter Punkt 1.5.4 beschrieben wird eine BKV assoziierte Nephropathie durch typische Zellveränderungen in den Tubuli, Glomeruli bzw. der Sammelrohre definiert, die sich durch positive immunhistochemische Färbungen für SV40 large T-Antigen auszeichnen [Drachenberg et al., 2003].

2.8 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem SPSS Software Programm (Version 16). Die Ergebnisse wurden in Form von Mittelwert +/- Standardabweichung oder Median beziehungsweise Interquartilenrange (25/75) aufgeführt.

Für die univariate Analyse binärer Parameter wurde der Chi-Quadrat-Test verwendet. Für die Auswertung nicht normalverteilter oder ordinaler Parameter diente der Mann-Whitney-Test.

Die Yates-Korrektur für die Chi-Quadrat-Verteilung fand für kleinere Stichprobenzahlen (< 10) Anwendung. Statistische Testergebnisse mit einem p-Wert < 5% wurden als signifikant angesehen.

Mit Hilfe der Kaplan-Meier-Methode erfolgte die Risikoschätzung für das Auftreten einer BK-Virurie, BK-Virämie und BKVAN.

Variablen die als Risikofaktoren für eine BK-Virusreplikation detektiert werden konnten, wurden mittels univariater Analyse evaluiert. Zusätzlich erfolgte die Durchführung einer multiplen Regressionsanalyse zur Identifikation wesentlicher Einflussvariablen.

Die Untersuchung der Korrelation zwischen zwei Zielgrößen fand mit Hilfe der Korrelationsanalyse nach Pearson statt.

3. Ergebnisse

3.1 prospektive Längsschnittstudie

3.1.1 Studienpopulation - Basischarakteristika

Das mittlere Alter der studienteilnehmenden Patienten betrug 48 +/- 16 Jahre. Der Anteil von männlichen Patienten lag bei 59%.

85% der Studienteilnehmer erhielten ihre 1. Nierentransplantation, 12% ihre 2. und 2% ihre 3. Nierentransplantation. Die wichtigsten klinischen Patientencharakteristika für die prospektive Längsschnittstudie sind in der Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: Patientencharakteristika – prospektive Längsschnittstudie (n = 233)

Empfängereigenschaften:	
Geschlecht (männlich/ weiblich in %)	59/ 41
Alter in Jahren	47.8 +/- 15.7
Anzahl der Nierentransplantation in %	
erste	85
zweite	12
dritte	2
vierte	1
HLA Mismatch (Anzahl)	2.66 +/- 1.85
Akute Rejektion, Patientenzahl (in %)	69 (29.5)
Spendereigenschaften:	
Alter in Jahren	50 +/- 14.9
kalte Ischämiezeit in Stunden	9.8 +/- 5.7

3.1.2 Ablauf der prospektiven Längsschnittstudie:

Für die prospektive Längsschnittstudie erfolgte die Sammlung und Messung der Blut- und Serumproben auf BK-Viruslast im Durchschnitt 2 Wochen, sowie 1-, 2-, 3-, 6-, 9-, 12 Monate post transplantationem.

Im Durchschnitt fanden sieben Messungszeitpunkte pro Patient statt.

Tabelle 9: Zeitpunkt der Messung in Tagen post TX (arithmetischer Mittelwert):

	1.Messung	2.Messung	3.Messung	4.Messung	5.Messung	6.Messung	7.Messung
Mittelwert	15,85	41,4	71,8	107	162,3	210	256

^o Die primären Endpunkte stellen BK-Virurie, BK-Virämie und BKVAN dar.

3.1.3 Immunsuppressive Therapie

In der prospektiven Längsschnittstudie erhielten 12 Patienten antithymozytäre Antikörper (= ATG) zur Einleitung der immunsuppressiven Therapie. Die anderen Patienten wurden mit Anti-IL-2-Rezeptor-Antikörpern anbehandelt. Die Langzeit-Immunsuppression bestand entweder aus einer Zweierkombination von einem Calcineurininhibitoren (Cyclosporin A oder Tacrolimus) mit Prednisolon oder aus einer Dreifachkombination eines Calcineurininhibitors mit Prednisolon und Mycophenolatmofetil (MMF). 19 Patienten, die mit einer Dreifachkombination behandelt wurden, erhielten anstatt eines Calcineurininhibitors einen mTor-Inhibitor (Sirolimus/ Rapamycin).

3.1.4 Behandlung der BKV-Infektion

Patienten, die eine relevante BK-Virämie/ -Virurie aufzeigten, d.h. ≥ 10.000 Kopien/ml im Serum bzw. $\geq 10.000.000$ Kopien/ml im Urin, erhielten eine therapeutische Intervention gemäß der Richtlinien. Bei allen Patienten (n = 28) wurde die Immunsuppression (IS) modifiziert oder leicht reduziert. So wurde bei 11 Patienten die Cyclosporindosis reduziert oder Tacrolimus durch Cyclosporin A, bei einem angestrebten Talspiegel von 100-150mg/ ml, ersetzt. 14 Patienten erhielten anstatt Mycophenolatmofetil (MMF) Azathioprin in einer Dosierung von 75mg täglich, kombiniert mit einer Methylprednisolondosis (MP) von 4mg täglich. Drei Patienten, welche

ursprünglich mit Sirolimus, MMF und MP therapiert wurden, erhielten anstatt MMF Azathioprin (75mg/ d).

Bei 13 von 14 Patienten mit klinisch relevanter BK-Virämie fand eine Änderung des Immunsuppressionsregimes circa 5-8 Wochen nach Detektion der BKV-Reaktivierung statt.

Daraufhin konnte bei 7 Patienten ein Rückgang der BK-Viruslast in Serum und Urin beobachtet werden. Sechs weitere Patienten, die initial nicht auf die Modifikation der Immunsuppression reagierten, d.h. weder ein Absinken der Viruslast, noch eine Funktionsverbesserung des Nierentransplantates oder der histologisch gesicherten BKVAN erkennen ließen, wurden zusätzlich in wöchentlichen Abständen mit dem Virustatikum Cidofovir (0,25mg/ kg intravenös) behandelt. Ein Patient wurde sogar von Anfang an mit einer Kombination aus einer reduzierten aufrechterhaltendem Immunsuppression und Cidofovir behandelt.

5 von 6 Patienten zeigten unter Reduktion der IS und antiviraler Therapie mit Cidofovir eine Normalisierung der BK-Viruslast sowie eine Verbesserung der Transplantatfunktion im Verlauf. Zwei Patienten sprachen auf diese Therapieform nicht an und entwickelten eine fortschreitende Verschlechterung der Transplantatfunktion mit anschließendem Transplantatverlust.

3.1.5 Assoziation zwischen BKV-Reaktivierung und akuter Transplantatabstoßung

Anhand der prospektiven Längsschnittstudie konnte der Zusammenhang zwischen einer BKV-Reaktivierung und einer sich entwickelnden Transplantatabstoßung untersucht werden. Es wurde aufgezeigt, dass bei Patienten mit persistierender BK-Virurie (1,33 +/- 2,34), im Vergleich zu Patienten mit transienter BK-Virurie (0,28 +/- 1,01), eine signifikant erhöhte Anzahl akuter Transplantatabstoßungen auftrat ($p < 0,03$).

Zusätzlich erfolgte die Evaluierung der Zeitspanne zwischen der BKV-Reaktivierung und dem Beginn der BKVAN/ akuten Rejektion. Entsprechend der erfassten Daten wiesen 24 Patienten (10,3%) ein gleichzeitiges oder aufeinanderfolgendes Auftreten von BKV-Reaktivierung und akuter Abstoßungsreaktion auf. So ging bei 11 von 24 Patienten der akuten Rejektion eine BKV-Reaktivierung im Durchschnitt 45 Tage voraus. 10 Patienten zeigten einen parallelen Ablauf von akuter Rejektion und BKV-Reaktivierung. Bei den verbliebenen 3 Patienten wurde eine BKV-Reaktivierung im Mittel 89 Tage vor Entwicklung einer akuten Abstoßungsreaktion diagnostiziert.

3.1.6 BK-Virurie und klinische Patientencharakteristika im Vergleich

Die Studienteilnehmer wurden auf verschiedene klinische Parameter hin untersucht. Unter anderem wurden Patientenalter, Spenderalter, HLA-Übereinstimmung, Art der Spende (Lebend- oder Post-mortem-Spende), ob bereits und wie viele vorherige Nierentransplantationen stattfanden, Art der einleitenden und Langzeit-Immunsuppressionen, sowie die Anzahl möglicher Abstoßungsepisoden verglichen. Diese Patientencharakteristika wurden in Form einer univariaten Analyse mit der BK-Virurie in Relation zueinander gestellt. Dabei konnte ein Zusammenhang zwischen persistierender BK-Virurie/ -Virämie und der Anzahl von Spender-Empfänger Mismatches in HLA-Klassen I Allelen beobachtet werden. Demnach wurde bei Patienten mit persistierender BKV-Replikation (3,5 +/- 1,8 Mismatche), im Vergleich zu Patienten mit fehlender oder transients BK-Virämie (2,66 +/- 1,8 Mismatche), eine höhere Anzahl von HLA- Klasse I-Mismatches nachgewiesen ($p < 0,01$).

Bezüglich des Lokus der verschiedenen HLA-Antigene (A, B und C) war keine statistische Differenz ermittelbar. Des Weiteren konnten keine Unterschiede in der Anzahl der Spender-Empfänger-Mismatches für HLA-Klasse II Moleküle festgestellt werden.

Ein wichtiges Charakteristikum des Spenderorgans (Lebend- oder Post-mortem-Spende) wurde ebenfalls hinsichtlich des Risikos für die Entstehung einer BKV-Infektion ausgewertet.

In der prospektiven Längsschnittsuntersuchung waren 79,4 % der Spenderorgane von Post-mortem-Spenden und 20,6% von Lebendspendern. Eine statistische Signifikanz zwischen Lebend- oder Leichenspende für die Inzidenz einer BKV-Reaktivierung in Urin oder Serum war nicht erkennbar.

Überdies konnte auch im Hinblick auf das Patienten- oder Spenderalter, die Anzahl erfolgter Transplantationen pro Patient, der einleitenden/ erhaltenden Immunsuppression keine Assoziation zur BK-Virurie gefunden werden.

3.2 BK-Viruslast-Kinetik

3.2.1 Untersuchung der BK-Viruslast-Kinetik

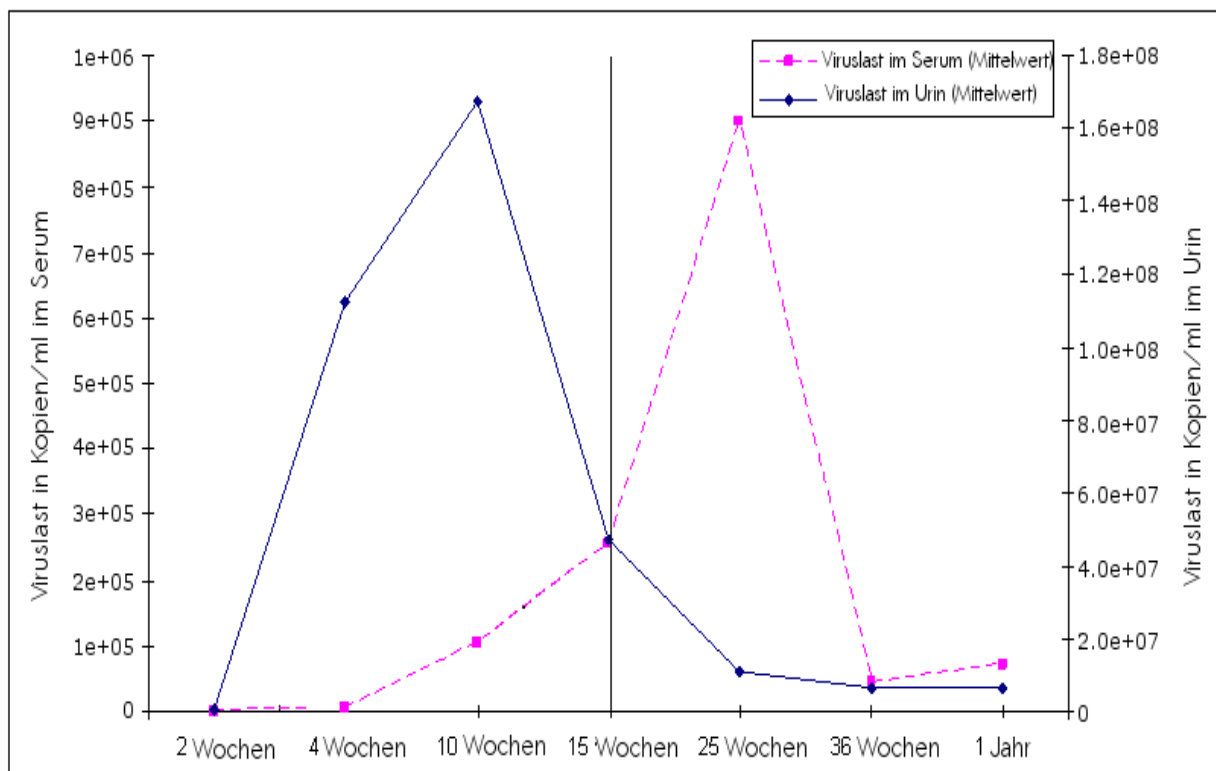
Der Beginn der BKV-Reaktivierung im Urin konnte im Durchschnitt in der 5. (2. - 41.) Woche nach erfolgter Nierentransplantation festgestellt werden. Dagegen wurde die erste Reaktivierung von BKV im Serum im Mittel erst in der 10. (5. - 51.) Woche post transplantationem detektiert.

In unserer Studie zeigte sich, dass eine BK-Virurie durchschnittlich 5 (2 - 10) Wochen vor Messung einer BK-Virämie bei den Patienten auftrat. 2 Patienten wiesen bereits in der 2. Woche nach erfolgter Nierentransplantation eine BK-Virurie auf. Die früheste Reaktivierung von BKV im Serum lag bei einem Patienten bereits in der 5. Woche post transplantationem.

Der Höchstwert der BK-Viruslast im Urin von $1,7E+008$ ($1,40E+004$ to $2,03E+009$) Kopien/ ml konnte im Mittel in der 10. (4. - 52.) Woche, der Maximalwert von BK-Viruslast im Serum von $8,9E+005$ ($1,80E+004$ to $3,01E+007$) Kopien/ ml in der 24. (1. - 52.) Woche ermittelt werden.

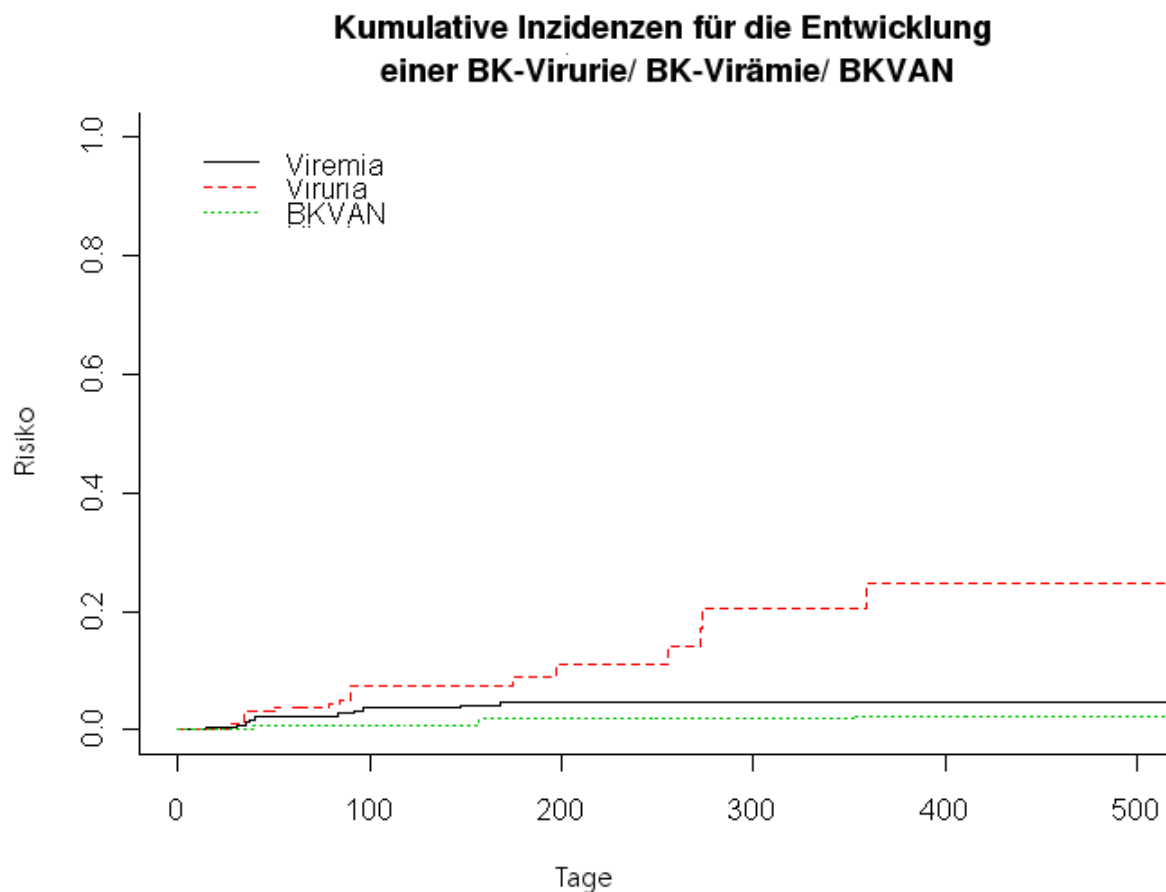
Bei zwei von sechs Patienten mit histologisch gesicherter BKVAN konnte im Verlauf die BK-Viruslast in Urin oder Serum nicht reduziert werden. Alle anderen Patienten erreichten nach IS-Modifikation im Median in der 21. (3. - 52.) Woche für Urin und in der 26. (9. - 52.) Woche für Serum ein Absinken der Viruslast unterhalb der Nachweisgrenze. (Abbildung 5)

Die Kaplan-Meyer-Analyse zeigt, dass im 1. Jahr nach Nierentransplantation ein Gesamtrisiko für die Entwicklung einer BK-Virurie, BK-Virämie und BKVAN zu 24,8%, 8% bzw. 3% besteht. (Abbildung 6)

Abbildung 5:

Kinetiken der BK-Viruslast und der sich entwickelnden BKVAN bei Patienten aus der prospektiven Längsschnittstudie (n=233).

Die durchgezogene Linie stellt die mittlere Viruslast im Urin (in Kopien/ ml), die gestrichelte Linie die mittlere Viruslast im Serum (in Kopien/ ml) dar. Der Maßstab für die Viruslast im Serum befindet sich auf der linken y-Achse, die Skala für die Viruslast im Urin auf der rechten y-Achse. Die vertikal, durchgezogene Linie markiert den mittleren Zeitpunkt für die Diagnosestellung einer BKVAN. Die Reaktivierung von BKV im Urin konnte 11 Wochen vor Diagnosestellung der BKVAN beobachtet werden. Diese Abbildung schließt alle Proben der prospektiven Studie ein.

Abbildung 6:

Das kumulative Risiko nierentransplantierter Patienten eine BK-Virurie und BK-Virämie zu entwickeln in % (prospektive Longitudinalstudie, n=233).

Die gestrichelte Linie = kumulatives Risiko eine BK-Virurie zu entwickeln; die durchgezogene Linie = kumulatives Risiko für die Entwicklung einer BK-Virämie; die punktierte Linie = kumulatives Risiko für die Entwicklung einer BKVAN.

Im 1. Jahr nach Nierentransplantation besteht ein Gesamtrisiko für die Entwicklung einer BK-Virurie, BK-Virämie und BKVAN zu 24,8%, 8% bzw. 3%.

3.2.2 BK-Viruslast-Kinetik und Entwicklung einer BKVAN

Histologische Untersuchungen von Nierentransplantatbiopsien belegten eine Inzidenz der BKVAN von 21,4% bei persistierend auftretender BK-Virurie. Die retrospektive Evaluierung der Kinetik der BKV-Infektion in Bezug auf die Entwicklung einer BKVAN zeigte, dass die Diagnosestellung der Nephropathie im Median 11 (4,3 - 18,3) Wochen nach erstmaliger Detektion einer BK-Virurie erfolgte.

3.3 Korrelation der BK- Virurie und BK- Virämie

3.3.3 Prävalenz der BK- Virurie und BK- Virämie

4128 Serum- und Urinproben wurden insgesamt für die Querschnitt - und prospektive Längsschnittstudie auf BKV- DNA untersucht.

Die Gesamtprävalenz für eine BK-Virurie lag in der Querschnittstudie bei 19 %, für eine BK-Virämie bei 7%.

Von den 233 Patienten, die für die prospektive Längsschnittstudie im 1. Jahr post transplantationem untersucht wurden, waren 54 Patienten (23%) mindestens einmal BKV positiv im Urin. Bei 16 Patienten (6,8%) erfolgte der BKV-Nachweis im Blut. Alle Patienten mit BK-Virämie wiesen ebenso im Urin eine BKV-DNA- Positivität auf.

Persistierende Serum- oder Urinpositivität, d.h. mindestens zwei oder mehr aufeinanderfolgende positive BKV-DNA-Befunde, konnten bei 28 Patienten (12%) bzw. 14 Patienten (6%) gemessen werden. Ebenso wie die Patienten mit transientem BKV-DNA-Nachweis im Serum, zeigten auch alle Patienten mit einer persistierenden BK-Virämie eine gleichzeitig bestehende BK-Virurie auf.

3.3.2 Zusammenhang zwischen BK-Virurie und BK-Virämie

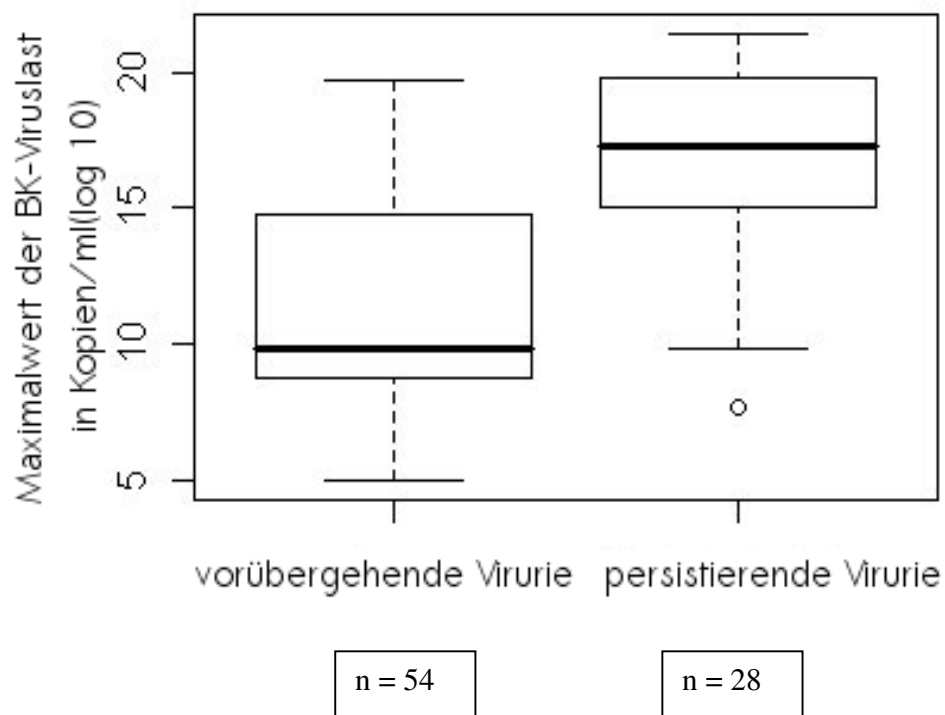
Entsprechend den gegenwärtigen Empfehlungen sollte die BK-Viruslast im Serum zur Diagnosestellung einer BKV-Infektion bestimmt werden. Des Weiteren haben vorangegangene Studien einen hohen prädiktiven Wert der BK-Virämie für die BKVAN beschrieben [Hirsch et al., 2002b].

Auch in dieser Arbeit wurde die Bestimmung der BK-Viruslast im Serum als Standardverfahren zur Diagnosestellung einer BKV-Reaktivierung angewendet. Hierbei erfolgte die Evaluierung der Analyse von BKV-DNA im Urin hinsichtlich ihrer Prädiktion für die Entwicklung einer BK-Virämie. Auf diese Weise konnte sowohl für die Sensitivität, als auch für den negativen prädiktiven Wert der BK-Virurie ein hervorragendes Ergebnis von 100% ermittelt werden. Die Spezifität und der positive prädiktive Wert der BK-Virurie als Vorhersagewert für eine BK-Virämie, lagen hingegen bedeutend niedriger bei 82 bzw. 29,6%.

Da eine BKV-Reaktivierung im Urin auch bei einem gewissen Anteil der gesunden Bevölkerung auftreten kann, wurden die gewonnenen Daten unter dem Aspekt der persistierenden BK-Virurie (= mindestens zwei positive BKV-DNA Messungen im Urin aufeinanderfolgend detektiert) erneut ausgewertet. Hierbei konnte eine Sensitivität von 100%, eine Spezifität von 94%, ein positiver prädiktiver Wert von 50% und ein negativer prädiktiver Wert von 100% aufgezeigt werden.

Außerdem stellte sich heraus, dass Patienten mit persistierender BK-Virurie, im Vergleich zu Patienten mit singulärer BK-Virurie, eine signifikant höhere BKV-DNA-Kopienanzahl aufwiesen. So betrug die BK-Viruslast im Urin bei persistierender BK-Virurie im Mittel $1,39E+008$ ($1,829E+05$ bis $1,645E+09$) Kopien/ml, bei transienter BK-Virurie $2,5E+007$ ($1,40E+04$ bis $4,39E+08$) Kopien/ml ($p < 0,01$). [Abbildung 7]

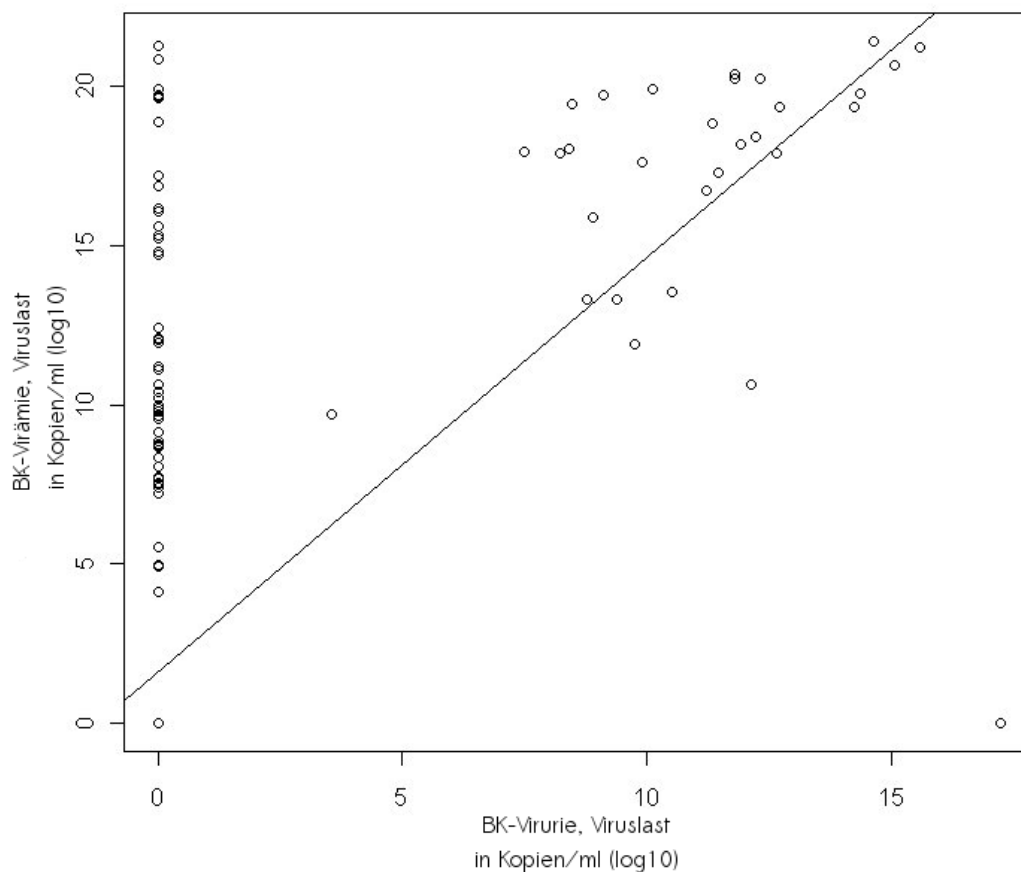
Ebenso konnte eine exzellente Korrelation der BKV-DNA-Befunde zwischen Serum und Urin beobachtet werden ($R^2 = 0.43$, $p < 0,001$). [Abbildung 8]

Abbildung 7:

Höhe der Viruslast (Kopien/ ml) im Urin bei Patienten mit einmaliger/ transienter und persistierender Virurie.

Die Peaks sind im logarithmischen Maßstab dargestellt und repräsentieren das Maximum der BK-Viruslast im Urin bei transienter und persistierender Virurie. Die fünf Linien in jeder Box präsentieren die geringstmögliche Viruskonzentration, geringere Quartile, Median, obere Quartile und die höchste BKV-DNA-Detektion.

Es konnte eine signifikant höhere BKV-Kopienanzahl in der Patientengruppe mit persistierender BK-Virurie (= mindestens zwei oder mehrere positive BKV-Messungen aufeinanderfolgend im Urin), als in jener mit transienter Virurie beobachtet werden. ($p < 0,01$).

Abbildung 8:**BK-Virurie versus BK-Virämie**

Die Beziehung der Peaks/ Scheitelpunkte von Patienten mit BK-Virurie und BK-Virämie zueinander, analysiert anhand der prospektiven Längsschnittstudie.

Die Darstellung der BK-Viruslasten in Kopien/ ml erfolgt im logarithmischen Maßstab. Die aufsteigende Gerade repräsentiert die lineare Regression $Y = f(X, \beta)$, mit $X = 1.303$ und $\beta = 1.590$. Die Daten weisen eine exzellente Korrelation auf ($R^2 = 0.43$, $p < 0.001$).

3.3.3 Vergleich der prädiktiven Werte von BK-Virurie und BK-Virämie

Unter Verwendung der histologischen Daten der Studienteilnehmer als Goldstandard für die Diagnosestellung einer BKVAN wurde der diagnostische Wert der BK-Virurie als möglicher Prädiktor für eine BKVAN evaluiert. Bei 6 von 233 Patienten (2,6%) der prospektiven Longitudinalstudie konnte eine BKVAN diagnostiziert werden. Patienten mit einer persistierenden BK-Virurie wiesen im Test eine Sensitivität von 100%, eine Spezifität von 91%, einen positiven prädiktiven Wert von 21,4% und einen negativen prädiktiven Wert von 100% für die Entstehung einer BKVAN auf.

Analysen der BK-Viruslast im Serum ergaben eine identisch hohe Sensitivität und einen negativen prädiktiven Wert von jeweils 100%. Die Spezifität und der positive prädiktive Wert der BK-Virämie für die Entwicklung einer BKVAN stellten sich im Vergleich zur BK-Virurie mit 96% bzw. 43% höher da.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand einer repräsentativen Studie die BKV-DNA in Serum und Urin bei insgesamt 433 nierentransplantierten Patienten analysiert.

Aus dieser Gruppe wurden 233 de novo Nierentransplantierte selektiert und anschließend im Verlauf des 1. Jahres im Durchschnitt 7x auf das Vorhandensein einer BK-Virurie und/ oder BK-Virämie untersucht.

In dieser prospektiven Längsschnittstudie konnte aufgezeigt werden, dass die persistierende BK-Virurie nicht nur eine exzellente Sensitivität und Spezifität für eine nachfolgende BK-Virämie aufweist, sondern auch eine frühe Prädiktion der BKVAN ermöglicht (im Mittel 11 Wochen vor Entwicklungsbeginn einer Nephropathie).

Das Monitoring einer BKV-Reaktivierung mit Hilfe der quantitativen PCR aus Patientenurin kann demzufolge eine frühe Identifizierung von Hochrisikopatienten für die Entwicklung einer BKVAN ermöglichen und so die Voraussetzung für einen therapeutisch nutzbaren Zeitvorsprung schaffen.

Inzwischen wurden diverse Studien zur Untersuchung der BK-Viruslast in Urin und Serum veröffentlicht [Hirsch et al., 2005a, Hirsch et al., 2005b, Dadhania et al, 2008]. Dort berichten verschiedene Autoren über die starke Korrelation zwischen BK-Virämie und Transplantatnephropathie. Diesbezüglich wird ein präventives Monitoring des Serums auf BK-Viruslast empfohlen. Umfassende Studiendaten waren zu diesem Zeitpunkt noch ausstehend [Brennan et al., 2005, Hirsch et al., 2005a]. Insbesondere das derzeitige Fehlen adäquater Therapieoptionen bei vorhandener BKVAN erklärt die Notwendigkeit einer frühzeitigen Diagnosestellung.

Es gibt bereits verschiedene Belege dafür, dass der Nachweis von Decoy-Zellen im Urin und eine BK-Virurie der BK-Virämie vorausgehen [Hirsch et al., 2005a, Dadhania et al, 2008].

Durch den Beginn der Virusreplikation in den Uroepithelialzellen, dem Latenzort des BKV, wird BKV-DNA durch Zellyse zuerst im Urin ausgeschieden, bevor es in die Blutbahn gelangt.

In diesem Zusammenhang war die Beschreibung der Kinetik der BKV-Replikation im Urin und im Serum sowie deren Wechselbeziehung zueinander noch nicht ausreichend bekannt.

Nach aktuellem Wissensstand stellt diese Studie die erste umfangreiche prospektive Längsschnittstudie dar, bei der die beginnende BKV-Infektion bis hin zur möglichen Entwicklung einer BKVAN post transplantationem in chronologischer Reihenfolge aufgezeichnet werden konnte.

Die Prävalenz für eine BK-Virurie und BK-Virämie betrug in der vorliegenden Studie 19% bzw. 7%. Ähnliche Prävalenzen wurden bereits in vorangegangenen Studien aufgezeigt [Awadalla et al., 2004, Bressollette-Bodin et al., 2005, Viscount et al., 2007].

Im Gegensatz zu der Studie von Awadalla et al., bei der drei Patienten mit BK-Virämie bei BKV negativem Urin beschrieben worden sind, konnte in unserer Studie keine BKV-Reaktivierung im Serum ohne vorangegangener BK-Virurie festgestellt werden [Awadalla et al., 2004].

Eine mögliche Erklärung für diese unterschiedlichen Beobachtungen könnte, wie die Autoren bereits selbst in ihrer Arbeit erörterten, durch eine differente Form der Probenentnahme begründet sein [Awadalla et al., 2004].

Die vorliegenden Studienergebnisse gehen weiterhin mit Daten von Hirsch et al. konform, die das Vorausgehen einer BK-Virurie bei nahezu jeder BK-Virämie beschreiben [Hirsch et al., 2005a].

Die Erfassung der BK-Virurie im Vergleich zur BK-Virämie bezogen auf die Prädiktion für die Entwicklung einer BKVAN deckte eine identisch hohe Sensitivität und einen negativen prädiktiven Wert von jeweils 100% auf. Demgegenüber wurde für die BK-Virämie eine höhere Spezifität und positiver prädiktiver Wert, im Vergleich zur BK-Virurie, festgestellt.

Da die BKV-Reaktivierung im Urin im Durchschnitt 5 Wochen vor Messung einer BK-Virämie bzw. 11 Wochen vor Diagnosestellung einer BKVAN detektiert werden konnte, ist im Gegensatz zur bisherigen Serumanalyse oder Darstellung klinischer Befunde ein deutlicher Zeitvorteil durch die BK-Viruslastanalyse im Urin als Frühmarker für eine BKVAN zu verzeichnen.

Dieser Zeitgewinn hätte jedoch nur einen Nutzen, wenn die Screeninguntersuchungen mindestens monatlich durchgeführt werden würden. Bisherige Behandlungsleitlinien empfehlen eine vierteljährliche Untersuchung des Patientenserums auf BKV-DNA im ersten Jahr post transplantationem [Lienkamp et al., 2008]. Innerhalb eines Zeitraumes von 3 Monaten kann bereits der gesamte Infektionsablauf, angefangen von der BK-Virurie bis hin zu BKVAN, stattfinden, ohne womöglich rechtzeitig detektiert worden zu sein.

Bressollette-Bodin et al. beschreiben in ihrer Studie, dass eine BKV-Reaktivierung zumeist innerhalb des 1. Quartals post transplantationem auftritt [Bressollette-Bodin et al., 2005], dies spiegelt sich ebenso in unserer Studie wieder. So ist zumindest im ersten Halbjahr nach erfolgter NTX ein monatliches Untersuchungsintervall des Urins auf BKV-DNA anzuraten.

Kritisch in dieser Studie zu betrachten ist der geringe positive prädiktive Wert der BK-Virurie mit 29,6% bzw. der BK-Virämie mit 43% bezüglich der Entstehung der BKV-assoziierten Nephropathie.

Die frühe histologische Diagnosesicherung einer BKVAN setzt die klinische Entscheidungsfindung das Transplantat zu biopsieren voraus.

Da unsere Patienten während der Studie besonders engmaschig auf eine BKV-Reaktivierung im Serum oder Rejektionszeichen des Transplantats untersucht wurden, konnte frühzeitig eine klärende Biopsie des Transplantats stattfinden. So ergab sich ein Zeitgewinn zwischen Diagnose einer BK-Virurie/ -Virämie und Auftreten einer manifesten BKVAN, der nicht einer verzögerten histologischen BKVAN-Sicherung geschuldet ist.

Der verhältnismäßig niedrige positive prädiktive Wert von BK-Virurie und BK-Virämie hinsichtlich der Entwicklung einer BKVAN ist demgemäß der frühzeitigen Diagnosesicherung mit anschließend zeitnahe therapeutischen Eingriff und entsprechender Verhinderung der Ausbildung einer BKVAN zu verdanken.

Ein weiteres interessantes Untersuchungsergebnis dieser Studie stellt die signifikant höhere Anzahl von HLA Mismatches bei Transplantierten mit persistierender Virurie/ -Virämie dar.

Auch hier gab es bereits in vorherigen Studien ähnliche Beobachtungen [Hirsch et al., 2002b, Awadalla et al., 2004]. Im Gegensatz zu den vorbestehenden Daten zeigte sich eine Assoziation zwischen Virurie/ Virämie und HLA-Mismatchzahl in dieser Studie lediglich auf die HLA-Klasse-I Allele bezogen. Es konnten keine Differenzen in der Anzahl der HLA-DR Mismatches (HLA-Klasse II Moleküle) zwischen Patienten mit oder ohne persistierender BK-Virurie/ -Virämie erkannt werden. Die Bedeutung der HLA-Klasse I Mismatches bei der BKV-Reaktivierung kann durch das Fehlen der Empfänger-MHC-Restriktion für die HLA-Klasse I Moleküle erklärt werden.

Die Präsentation von BK-Viruspeptiden durch die MHC-I-Moleküle der Transplantatzellen kann bei vermehrtem HLA-Klasse I Mismatch zu einer insuffizienten T-Zellantwort führen, da die gezielte

viruspezifische Epitoperkennung durch die körpereigenen T-Lymphozyten nicht stattfinden kann. Aufgrund der fehlenden MHC-Restriktion bleibt eine gezielte, selektive Zerstörung der BK-virusbefallenen Zellen aus.

Im Gegensatz dazu erfolgt die Präsentation von BKV-Peptiden in Zusammenhang mit HLA Klasse II Molekülen typischerweise durch Empfänger-APC's (Antigen-präsentierende Zellen), so kann die Antigenerkennung mit anschließender T-Zellaktivierung stattfinden, wodurch die fehlende Assoziation zwischen HLA Klasse II Mismatche und BK-Virämie/ -virurie zu erklären wäre.

Andererseits ist die geringere Übereinstimmung der HLA-Allele ein bereits bekannter Risikofaktor bei der BKV-Reaktivierung, der zu einer erhöhten Rate von Abstoßungsepisoden führt [Hirsch et al., 2002b, Awadalla et al., 2004]. Tatsächlich zeigten in dieser Studie Patienten mit persistierender BK-Virurie/ -Virämie eine erhöhte Frequenz an Abstoßungsreaktionen, im Gegensatz zu Patienten mit einmalig/ vorübergehend aufgetretener BKV-DNA im Urin/ Serum.

Auswertungen bezüglich des zeitlichen Ablaufes einer beginnenden BVKAN/ akuten Rejektion ließen erkennen, dass annähernd 50% (n = 11) der Patienten mit simultaner oder sequentieller Manifestation einer BKV-Reaktivierung und akuter Abstoßungsreaktion, letztere im Durchschnitt 1,5 Monate vor Detektion einer BKV-Reaktivierung, aufwiesen. Bei 3 Patienten die sowohl von einer BKV-Reaktivierung, als auch von einer akuten Abstoßungsreaktion betroffen waren, ging eine BKV-Reaktivierung der Rejektion voraus. Bei den übrigen 10 Patienten traten beide Ereignisse gleichzeitig auf. Die gewonnenen Daten demonstrieren, dass letztendlich in der Hälfte der Fälle eine inflammations-getriggerte Rejektion die mögliche Ursache für die Reaktivierung des latenten BK-Virus darstellt.

Andererseits kann die potentere Immunsuppressionstherapie zur Reduktion der Immunabwehr und Vermeidung einer so bedingten akuten Rejektion als eine weitere Ursache für die BKV-Reaktivierung aufgezählt werden. Die von Hirsch et al. und Alméras et al. beschriebene Rejektion von Allotransplantaten, welche durch die IS-Reduktion bei aufgetretener BKV-Infektion hervorgerufen worden ist, konnte anhand unserer Studienpopulation nicht bestätigt werden [Hirsch et al., 2005b, Alméras et al., 2008]. Die Modifizierung des Immunsuppressionsschemas anstelle von alleiniger IS-Reduktion scheint eine zuverlässige Herangehensweise bei der Behandlung der BKV-Infektion zu sein.

In der Tat zeigten in dieser Studie 50% der Patienten mit klinisch relevanten persistierenden BK-Virurie/ -Virämie initial ein therapeutisches Ansprechen in Form des Absinkens der BK-Viruslast 5 bis 8 Wochen nach Abwandlung des IS-Schemas. Bei weiteren 36% der Patienten konnte sogar eine Reduktion der Viruslast unterhalb der Nachweisgrenze und eine Verbesserung der Transplantatfunktion nach zusätzlicher antiviraler Therapie mit Cidofovir erzielt werden.

Die vorliegende Studie weist jedoch einige Limitationen auf. Zum einen ist die Anzahl der BKVAN-Erkrankten auf 6 Patienten begrenzt. Nichtsdestotrotz konnte bei allen Patienten, die im Verlauf eine BKVAN entwickelten, bereits Wochen vor Auftreten klinischer Symptome der Nephropathie eine BK-Virurie/ -Virämie nachgewiesen werden.

Des Weiteren wurde die Mehrheit der Patienten initial mit Tacrolimus/ MMF basierten IS-Schema behandelt, so dass Schlussfolgerungen bezüglich der Wirkung unterschiedlicher IS-Regime nicht getroffen werden können.

Ferner erfolgte die Beobachtung der Patienten auf BKV-Reaktivierung nur innerhalb des 1. Jahres post transplantationem. Dies könnte zu einer Unterschätzung der BKV - Prävalenz unserer Studienpatienten geführt haben.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die erfassten Studiendaten eine starke Korrelation zwischen persistierender BK-Virurie und BK-Virämie demonstrieren.

Persistierende BK-Virurie kann demzufolge mit einer Sensitivität von 100%, einer Spezifität von 94% und einem positiven prädiktiven Wert von 50% für eine BK-Virämie als zuverlässiger Marker zur frühzeitigen Identifizierung von BKVAN-Hochrisikopatienten verwendet werden.

Die Detektion einer singulär auftretenden BK-Virurie dagegen ist mit einer geringeren Spezifität (82%) und einem positiven prädiktiven Wert von 29,6% für die Entstehung der BK-Virämie erheblich aussageschwächer und nicht allein als prognostischer Indikator für die Entwicklung einer BKVAN zu empfehlen.

Um den in dieser Arbeit ermittelten zeitlichen Behandlungsvorsprung von durchschnittlich 5 Wochen vor Ausbildung einer BK-Virämie und 11 Wochen vor Entwicklung einer BKV assoziierten Nephropathie zu erzielen, müsste eine Verkürzung der Untersuchungsintervalle stattfinden. Das Screening des Urins auf BKV-DNA ist zumindest im 1. Halbjahr post transplantationem in monatlichen Abständen anzuraten.

Durch frühzeitige Modifizierungen des Immunsuppressionsschemas konnte in dieser Studie bei der Hälfte der Patienten mit klinisch relevanter persistierender BK-Virurie/ -Virämie initial ein therapeutisches Ansprechen in Form von einem Absinken der BK-Viruslast erreicht werden. Bei 36% der Patienten wurde sogar eine Reduktion der Viruslast unterhalb der Nachweisgrenze und Verbesserung der Transplantatfunktion erzielt. Anstelle von alleiniger IS-Reduktion stellt sich in dieser Studie die zusätzliche Modifizierung des Immunsuppressionsschemas als eine vielversprechende Herangehensweise bei der Behandlung der BKV-Infektion dar, jedoch bedarf es weiterer Studien zur Beurteilung unterschiedlicher IS-Regime und deren Modifikation.

5. Abkürzungsverzeichnis

ATG	Antithymozytenglobulin/ - Antikörper
BKV	BK - Virus
BKVAN	BK-Virus assoziierte Nephropathie
BKV- IgG	BK-Virus- Immunglobulin G
„Carry- over“ - Kontamination	Übertragungskontamination
CT	Cycle Threshold ("Schwellenwert-Zyklus")
DNA	Desoxyribonukleinsäure
De novo	neu, von Anbeginn
GF	Grundfluoreszenz
Hbs-Antigen	Hepatitis B - Hüll-/ Oberflächenantigen
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	Humanes Leukozytenantigen
IL-2	Anti-Interleukin-2-Rezeptor-Antikörper
IS	Immunsuppression

MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MMF	Mycophenolat-Mofetil
MP	Methylprednisolon
n	Anzahl der Patienten
NTX	Nierentransplantation
„Off-Label“-Anwendung	zulassungsüberschreitende Anwendung
PCR	Polymerase - Kettenreaktion
PML	progressive multifokale Leukoenzephalopathie
Post TX	nach Nierentransplantation
PRA	<i>panel reactive antibodies</i> (Antikörper gegen ein Lymphozytenpanel)
PVAN	Polyomavirus assoziierte Nephropathie (= BKVAN)
Rn	<i>reporter normalization</i> , gemessene Fluoreszenzfarbstoffe (Sybr-Green, ROX)
ΔRn	Höhe des Signales, dass durch die jeweiligen Reaktionsbedingungen bei der PCR bestimmt wird ($\Delta Rn = (Rn+) - (Rn-)$)
rt-PCR	<i>real-time PCR</i>

UNG-Enzym

hitzelabile Uracil-DNA-glycosylase von Atlantic

VP1-Region

Virusprotein 1-Region

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: BK-virusassoziierte Erkrankungen bei Immunkompromittierten 12

Abbildung 2: Übersicht Arbeitsschritte..... 26

Abbildung 3: Schematische Darstellung des Prinzips der TaqMan - PCR 31

Abbildung 4: Beispiel einer Amplifikationsgraphik 32

Abbildung 5: Kinetiken der BK-Viruslast und der sich entwickelnden BKVAN
bei Patienten aus der prospektiven Längsschnittstudie (n=233)..... 43

Abbildung 6: Das kumulative Risiko nierentransplantierter Patienten
eine BK-Virurie und BK-Virämie zu entwickeln in %
(prospektive Longitudinalstudie, n=233)..... 44

Abbildung 7: Höhe der Viruslast (Kopien/ ml) im Urin bei Patienten mit
einmaliger/ transienter und persistierender Virurie 47

Abbildung 8: Die Beziehung der Peaks/ Scheitelpunkte von Patienten mit
BK-Virurie und BK-Virämie zueinander, analysiert anhand
der prospektiven Längsschnittstudie. 48

Tabellenverzeichnis

<u>Tabelle 1:</u>	Apparative Ausstattung	22
<u>Tabelle 2:</u>	Reagenzien/ Chemikalien.....	23
<u>Tabelle 3:</u>	QIAamp Ultra Sens Virus Kit (250)	24
<u>Tabelle 4:</u>	PCR – Reaktionsansatz	34
<u>Tabelle 5:</u>	Polyomavirus-Primer (Firma Metabion).....	34
<u>Tabelle 6:</u>	Polyomavirus-VP1-Sonde (Firma Eurogentec)	34
<u>Tabelle 7:</u>	Thermocyclerprogramm.....	35
<u>Tabelle 8:</u>	Patientencharakteristika – prospektive Längsschnittstudie (n = 233).....	38
<u>Tabelle 9:</u>	Zeitpunkt der Messung in Tagen post TX (arithmetischer Mittelwert)	39

6. Literaturverzeichnis

- ALMÉRAS C, FOULONGNE V, GARRIGUE V ET AL. Does reduction in immunosuppression in viremic patients prevent BK virus nephropathy in de novo renal transplant recipients? A prospective study. *Transplantation* 2008;85:1099-104
- AWADALLA Y, RANDHAWA P, RUPPERT K, ET AL. HLA mismatching increases the risk of BK virus nephropathy in renal transplant recipients, *Am J Transplant*. 2004;4: 1691-1696.
- BARRI YM, AHMAD I, KETEL BL, BARONE GW, WALKER PD, BONSIB SM, ABUL-EZZ SR. Polyoma viral infection in renal transplantation: the role of immunosuppressive therapy. *Clin Transplant*. 08/ 2001; 15: 240-6
- BEIMLER, J.. BK-Virus-Nephropathie nach Nierentransplantation. *Nephrologe* 2008; 3: 14-21
- BINET I, NICKELEIT V, HIRSCH HH, PRINCE O, DALQUEN P, GUDAT F, MIHATSCH MJ, THIEL G. Polyomavirus disease under new immunosuppressive drugs: a cause of renal graft dysfunction and graft loss. *Transplantation* 1999; 67:918-22
- BONVOISIN C, WEEKERS L, XHIGNESSE P ET AL. Polyomavirus in renal transplantation: a hot problem. *Transplantation* 2008, 85 (7 Suppl):S42-8
- 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: 582–594
- BRESSOLLETTE-BODIN C, COSTE-BUREL M ET AL. A prospective longitudinal study of BK virus infection in 104 renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2005; 5: 1926–1933

- CELIK B, SHAPIRO R, VATS A, RANDHAWA PS. Polyomavirus allograft nephropathy: sequential assessment of histologic viral load, tubulitis, and graft function following changes in immunosuppression. *Am J Transplant.* 11/ 2003; 3: 1378-82
- DADHANIA D, SNOBKOWSKI C, DING R ET AL. Epidemiology of BK virus in renal allograft recipients: independent risk factors for BK virus replication. *Transplantation* 2008; 5: 582-594.
- DRACHENBERG C. B., PAPADIMITRIOU J. C., WALI R., ET AL. BK polyoma virus allograft nephropathy: ultrastructural features from viral cell entry to lysis, *Am J Transplant* 2003; 3:1383
- DRACHENBERG, C.B.; PAPADIMITRIOU, J.C.. Polyomavirus-associated nephropathy: update in diagnosis. *Transplant Infectious Disease* 2006a; 8: 68-75
- DRACHENBERG, CINTHIA B., JOHN C. PAPADIMITRIOU, EMILIO RAMOS. Histologic versus Molecular Diagnosis of BK Polyomavirus-Associated Nephropathy: A Shifting Paradigm? *Clin J Am Soc Nephrol* 1; 2006b: 374-379
- FARASATI NA, SHAPIRO R ET AL. (2005) Effect of leflunomide and cidofovir on replication of BK virus in an in vitro culture system. *Transplantation* 79: 116–118
- FISCHEREDER, PROF. DR. MICHAEL. Polyomavirus-Nephropathie. Übersichtsbeitrag. *Nephrologie im Dialog* 1/2008
- 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. Polyomavirus BK infection in pediatric kidney-allograft recipients: a single-center analysis of incidence, risk factors, and novel therapeutic approaches. *Transplantation.* 2003 Apr; 75: 1266-70

- HELDERMAN JH, BENNETT WM, CIBRIK DM, KAUFMAN DB, KLEIN A, TAKEMOTO SK.
Immunosuppression: practice and trends. Am J Transplant 2003; 3 Suppl 4: 41-52.
- HIGUCHI R., DOLLINGER G., WALSH P.S., GRIFFITH R. Simultaneous amplification and
detection of specific DNA sequences. Biotechnology (N Y) 1992; 10: 413-7
- HIGUCHI ET AL. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions.
Biotechnology (N Y). 1993 Sep;11(9):1026-30
- HIRSCH HH, MOHAUPT M, KLIMKAIT T. Prospective monitoring of BK virus load after
discontinuing sirolimus treatment in a renal transplant patient with BK virus nephropathy.
J Infect Dis. 01/ 2001; 184: 1494-5
- HIRSCH HH. Polyomavirus BK nephropathy: a (re-)emerging complication in renal transplantation.
Am J Transplant. 2002a; 2: 25-30
- HIRSCH HH, KNOWLES W, DICKENMANN M, PASSWEG J, KLIMKAIT T, MIHATSCH MJ,
STEIGER J. Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in
renal-transplant recipients. N Engl J Med 2002b; 347: 488-496
- HIRSCH HH. BK virus replication and disease in solid organ transplant recipients: An update. Curr
Opin Organ Transplant 2003a: 262-8
- HIRSCH HH. Polyomavirus associated nephropathy. A new opportunistic complication after kidney
transplantation, Der Internist 2003b; 44:653
- HIRSCH HH, STEIGER J. Polyomavirus BK. Lancet Infect. 2003c; Dis 3: 611-623
- HIRSCH HH, MICHAEL DICKENMANN, SIMONE BINGGELI, JÜRIG STEIGER „Alte Viren –
neue Immunsuppressiva: liason dangereuse?“ Schweiz Med Forum 2004; 4: 538-541

HIRSCH HH, BRENNAN DC, DRACHENBERG CB, GINEVRI F, GORDON J, LIMAYE AP, MIHATSCH MJ, NICKELEIT V, RAMOS E, RANDHAWA P, SHAPIRO R, STEIGER J, SUTHANTHIRAN M, TROFE J. Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analyses and recommendations. *Transplantation*. 2005a; 79: 1277-86

HIRSCH HH., DRACHENBERG C. B, JUERG STEIGER, EMILO RAMOS. Polyomavirus-associated Nephropathy in Renal Transplantation: Critical Issues of Screening and Management. *Madame Curie Bioscience Database*, 04/ 2006
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=eurekah&part=A51106> [letzter Zugriff am 10.01.2010]

HOISCHEN, S., Polyomavirus (BK-Virus). *Nierenratgeber* 04/ 2007,
URL:<http://www.nierenratgeber.de/nierentransplantation/themen/problemekomplikationen/infektionen/polyoma-virus.html> [letzter Zugriff am 23.09.2009]

KNOWLES W. A., PIPKIN P., ANDREWS, N., ET AL. Population-based study of antibody to the human polyomaviruses BKV and JCV and the simian polyomavirus SV40, *Journal of medical virology* 2003; 71: 115.

LI RM, MANNON RB, KLEINER D, TSOKOS M, BYNUM M, KIRK AD, KOPP JB.
BK virus and SV40 co-infection in polyomavirus nephropathy. *Transplantation* 12/ 2002; 74: 1497-504

LIENKAMP S., GERKE P., BK-Virusnephropathie - Ärztliche Behandlungsleitlinie 2008
URL: http://skl14b.ukl.uni-freiburg.de/nephrologie/live/therapiestandards/standard_bk-virus-nephropathie_200801.pdf [letzter Zugriff am 14.11.2009]

MEIER, SUSANNE. Analyse der Expression von Todesliganden und der Gewebeschädigung im zentralen Nervensystem in einem Tiermodell der Multiplen Sklerose. *Dissertation* 2008,25-30

- 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.
- NICKELEIT V, SINGH HK, MIHATSCH MJ. Polyomavirus nephropathy: morphology, pathophysiology and clinical management. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2003; 12:599-605
- PANG XL, DOUCETTE K, LEBLANC B, COCKFIELD SM, PREIKSAITIS JK: 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* 2007, 45:3568-3573.
- POLO C., PEREZ J. L., MIELNICHUCK A., FEDELE C. G., ET AL. Prevalence and patterns of polyomavirus urinary excretion in immunocompetent adults and children, *Clin Microbiol Infect* 2004; 10:640
- RAMOS E, DRACHENBERG CB, PAPADIMITRIOU JC, HAMZE O, FINK JC, KLASSEN DK, DRACHENBERG RC, WILAND A, WALI R, CANGRO CB, SCHWEITZER E, BARTLETT ST, WEIR MR. Clinical course of polyoma virus nephropathy in 67 renal transplant patients. *J Am Soc Nephrol.* 08/2002; 13: 2145-51
- RANDHWA PS, FINKELSTEIN S, SCANTLEBURY V, ET AL. Human polyoma virus-associated interstitial nephritis in the allograft kidney. *Transplantation* 1999; 67: 103
- SCHEER, CAROLA. Nachweis von Aspergillus-fumigatus-Infektionen aus dem Respirationstrakt dimittels TaqMan-PCR; 2006 Dissertation
- SMITH JM, MCDONALD RA, FINN LS ET AL. Polyomavirus nephropathy in pediatric kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2004; 4: 2109-2117

- STOLT A, SASNAUKAS K, KOSKELA P ET AL. Seroepidemiology of the human polyomaviruses. 2004 ; J Gen Virol 84: 1499-1504
- TROFE J, CAVALLO T, FIRST MR ET AL. Polyomavirus in kidney and kidney-pancreas transplantation: a defined protocol for immunosuppression reduction and histologic monitoring. Transplant Proc 2002; 34: 1788–1789
- TROFE J, GABER LW, STRATTA RJ, SHOKOUH-AMIRI MH, VERA SR, ALLOWAY RR, LO A, GABER AO, EGIDI MF. Polyomavirus in kidney and kidney-pancreas transplant recipients. Transpl Infect Dis. 03/2003; 5: 21-8
- VISCOUNT HB, EID AJ, ESPY MJ ET AL. Polyomavirus polymerase chain reaction as a surrogate marker of polyomavirus-associated nephropathy. Transplantation. 2007; 84: 340-345.
- WADEI H. M., RULE A. D., 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
- WILLIAMS JW, JAVAID B, KADAMBI PV ET AL. Leflunomide for polyomavirus type BK nephropathy. N Engl J Med 2005; 352: 1157–1158

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikation:

Babel Nina *; Fendt Juliane *; Karaivanov Stoyan; Bold Gantuja; Arnold Steffen; Sefrin Anett; Lieske Evelyn; Hoffzimmer Martin; Dziubianau Mikalai; Bethke Nicole; Meisel Christian; Grütz Gerald; Reinke Petra

Sustained BK viruria as an early marker for the development of BKV-associated nephropathy: analysis of 4128 urine and serum samples.

Transplantation 2009; 88(1):89-95.

* The first two authors contributed equally to this paper.

Kongressbeiträge:

1. European Renal Association (45th Congress); Stockholm, Schweden; May 10-13, 2008

Orale Präsentation und Excellence Award of the 45th Congress of the ERA-EDTA

Nina Babel, Juliane Fendt, Stoyan Karaivanov, Lydia Stele, Hans-Dieter Volk, Petra Reinke

Monitoring of BKV load in urine allows identification of patients with the high risk of BKV-associated nephropathy several weeks prior to development of viremia: analyses of 4128 urine and serum samples

2. American Transplant Congress 2008; Toronto, Canada; May 31 - June 4, 2008

Posterpräsentation/ Abstract

Juliane Fendt, Stoyan Karaivanov, Lydia Stele, Hans-Dieter Volk, Petra Reinke, Nina Babel

Monitoring of BKV load in urine allows identification of patients with the high risk of BKV-associated nephropathy several weeks prior to development of viremia

Erklärung

„Ich, Juliane Fendt, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *„Persistierende BKV-Viruslast im Urin als ein früher Marker für die Entwicklung einer BKV-assoziierten Nephropathie bei nierentransplantierten Patienten“* 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.“

Datum

Unterschrift

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei all denjenigen herzlich bedanken die sowohl fachlich als auch zwischenmenschlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Frau Prof. Dr. Petra Reincke danke ich für die interessante Themenstellung, die Möglichkeit in ihrem Arbeitskreis meine Promotionsarbeit anfertigen zu dürfen und die Bereitstellung notwendiger Ressourcen.

Innigster Dank geht an Frau PD Dr. Nina Babel für die hervorragende, jahrelange Betreuung dieser Arbeit, die zahlreichen Anregungen und Diskussionen mit denen sie wesentlich zur Fertigstellung der Arbeit beigetragen hat.

Die Forschung unverkrampft und leidenschaftlich näher gebracht, ist sie mir auch menschlich sehr ans Herz gewachsen.

Für die angenehme Arbeitsatmosphäre möchte ich den Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Immunologie Charité danken.

Besonderer Dank gilt hier Evelyn Lieske und Stoyan Karaivanov, die mich nicht nur ausführlich in die Methode der RT-PCR eingearbeitet, sondern auch für einiges an Vergnügen an langen Labortagen/ -nächten gesorgt haben.

Auch den Mitarbeitern und Patienten der Transplantationsambulanz des Virchowklinikums Charité möchte ich für die Sammlung und Bereitstellung der Daten und Proben danken.

Des Weiteren danke ich meinem Studienfreund Sascha Tafelski für das kritische Korrekturlesen meiner Promotionsschrift. So verhalf er mir das ein oder andere Mal zu mehr stilistischer als auch inhaltlicher Klarheit.

Von ganzem Herzen möchte ich meinen Eltern und meinem Bruder für die stetige Unterstützung, das Vertrauen und den Glauben an mich danken.

Nicht zuletzt danke ich meinem Partner Martin Hoffzimmer für seine unermüdbare Geduld, Wärme und Zuversicht, sowohl für die fachliche Zusammenarbeit, als auch für den umfassenden Ausgleich im Privaten und dem Blick für das Wesentliche im Leben. Ich liebe dich.