

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie und Internistische
Intensivmedizin, Berlin-Brandenburger Centrum für Regenerative Therapien, CVK der
Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

*Untersuchung der zellulären und molekularen Mechanismen der Polyomavirus-
spezifischen Immunantwort bei Patienten nach Nierentransplantation*

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Karin Müller
aus Berlin

Datum der Promotion: 25. Oktober 2013

Gutachter:

Priv. -Doz. Dr. med. N. Babel

Priv. -Doz. Dr. med. M Wiesner

Prof. Dr. F. Kern

Inhaltsverzeichnis

1. ABSTRACT	4
2. EINLEITUNG	6
3. ZIELE	7
4. METHODEN	8
4.1 Studiendesign	8
4.2 Quantitative Real-Time PCR zur Bestimmung der BK Viruslast	8
4.3 Untersuchung der BKV spezifischen zellulären Immunantwort	8
4.4 Peptide zur BKV-spezifischen Stimulation	9
4.5 Polychromatische Durchflusszytometrie	10
4.6 Enzyme Linked Immunospot Technique (ELISPOT)	11
4.7 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) zum Nachweis BKV-spezifischer Antikörper	11
4.8 Statistische Analysen	11
5. ERGEBNISSE	12
5.1 Publikation 1:	12
Untersuchung der Beteiligung zellulärer Immunität an der Pathogenese einer BKVN in einer retrospektiven Patientenstudie – als Originalarbeit veröffentlicht unter <i>‘BK-VP3 as a New Target of Cellular Immunity in BK Virus Infection’</i>	12
5.2 Publikation 2:	13
Untersuchung der BKV-spezifischen zellulären und humoralen Immunität im Verlauf der BKV-Infektion – als Originalarbeit veröffentlicht unter <i>‘BK Virus-Specific Immunity Kinetics: A Predictor of Recovery From Polyomavirus BK-Associated Nephropathy’</i>	13
5.3 Publikation 3:	14
Etablierung einer zeit- und kostensparenden Methode für die Quantifizierung und Qualifizierung von BKV-spezifischen T-Zellantworten für eine schnelle Prognostizierung und therapeutische Intervention im Krankheitsverlauf – als Originalarbeit veröffentlicht unter <i>‘Novel Approach for Improved Assessment of Phenotypic and Functional Characteristics of BKV-Specific T-Cell Immunity’</i>	14
6. DISKUSSION	16
7. SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK	18
8. LITERATURREFERENZEN	19
9. ANTEILSERKLÄRUNG	21
10. DRUCKEXEMPLARE DER AUSGEWÄHLTEN PUBLIKATIONEN	22
11. LEBENSLAUF	50
12. PUBLIKATIONSLISTE	53
13. SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	55
14. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	56
15. DANKSAGUNG	57

1. Abstract

Polyomavirus BK assoziierte Nephropathie ist eine schwerwiegende Komplikation der Posttransplantationsperiode bei nierentransplantierten Patienten. So führt die Infektion mit Polyomavirus BK (BKV) und die Progression zu Polyomavirus BK assoziierter Nephropathie (BKVN) in bis zu 50 Prozent der Fälle zu einer Nierendysfunktion und zum Verlust der Niere. Regulationsmechanismen, die zur Virusreaktivierung und anschließender Transplantatschädigung führen, sind bis jetzt nicht ausreichend untersucht. Es existiert bisher keine spezifische antivirale Therapie.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll geklärt werden, welchen Einfluss die zelluläre Immunantwort auf den klinischen Verlauf einer Polyomavirus BK-Infektion hat. Im Besonderen wird hier erstmalig die BKV-Immunität gegen alle fünf BKV-Proteine untersucht werden. Des Weiteren liegen bis dato wenig Daten über die BKV-spezifische Immunität im Verlaufe der Infektion vor. Die Beleuchtung dieses Aspektes stellt einen weiteren Teil der vorliegenden Arbeit dar. Aufbauend auf den Ergebnissen aus den vorher genannten Zielstellungen wird eine Methodik zum Monitoring nierentransplantierte Patienten entwickelt, die sowohl zeit-, als auch blut- und kostensparend und von Bench-to-Bedside, also in der Klinik relevant sein wird.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass alle 5 BKV-Proteine (VP1, VP2, VP3, LT, st) eine T-Zell-vermittelte, von CD4-positiven T-Zellen dominierte Immunantwort auslösen. Dabei steigt die BKV-spezifische zelluläre Immunität gegen alle fünf BKV-Antigene im zeitlichen Verlauf der BKV-Infektion signifikant und erreicht ihren Höhepunkt zum Zeitpunkt der Resolution der BKV-Infektion. T-Zellen spezifisch für BKV-Strukturproteine sind hierbei früher nachweisbar als T-Zellen gegen regulatorische BKV-Proteine. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Schwere der BKV-Infektion mit der Frequenz der BKV-spezifischen CD4-positiven T-Zellen korreliert und BKV-spezifische T-Zellen während des Infektionsverlaufes bei Patienten mit selbstlimitierter BKV-Infektion früher nachweisbar sind als bei Patienten mit Progression zu einer BKVN. Des Weiteren besteht ein Zusammenhang zur Nachweisbarkeit multifunktionaler BKV-spezifischer CD4-positiver T-Zellen. Diese wurden vermehrt bei Patienten ohne Progression zu BKVN bzw. mit einem kürzeren Krankheitsverlauf detektiert.

Die zelluläre BKV-Immunität wird also nicht – wie es früher angenommen wurde – allein durch T-Zellen gegen VP1 und LT repräsentiert. Das T-Zell-Repertoire bzw. die Antigenspezifität ist im Gegenteil sehr divers und von Patient zu Patient verschieden. Somit ist die Messung der Immunantwort gegen VP1 und LT nicht ausreichend, um den

Immunstatus bei BKV-infizierten Individuen zu erfassen. Um der Individualität der BKV-Immunität gerecht zu werden und in einem Untersuchungsansatz alle theoretisch vorhandenen, errechenbaren BKV-T-Zell-Epitope abzudecken, entwickelten wir ein Monitoring-Protokoll zum schnellen, blut- und kostensparenden Einsatz in der Klinikpraxis. Mittels gemischten Overlapping Peptide Pools (MOPP), ist es uns hiermit zusätzlich möglich neben BKV-spezifischen CD4-positiven T-Zellen auch CD8-positiven T-Zellen nachzuweisen. Dieses Verfahren wird daher für das Monitoring von potentiellen BKV-infizierten Patienten nach Nierentransplantationen empfohlen.

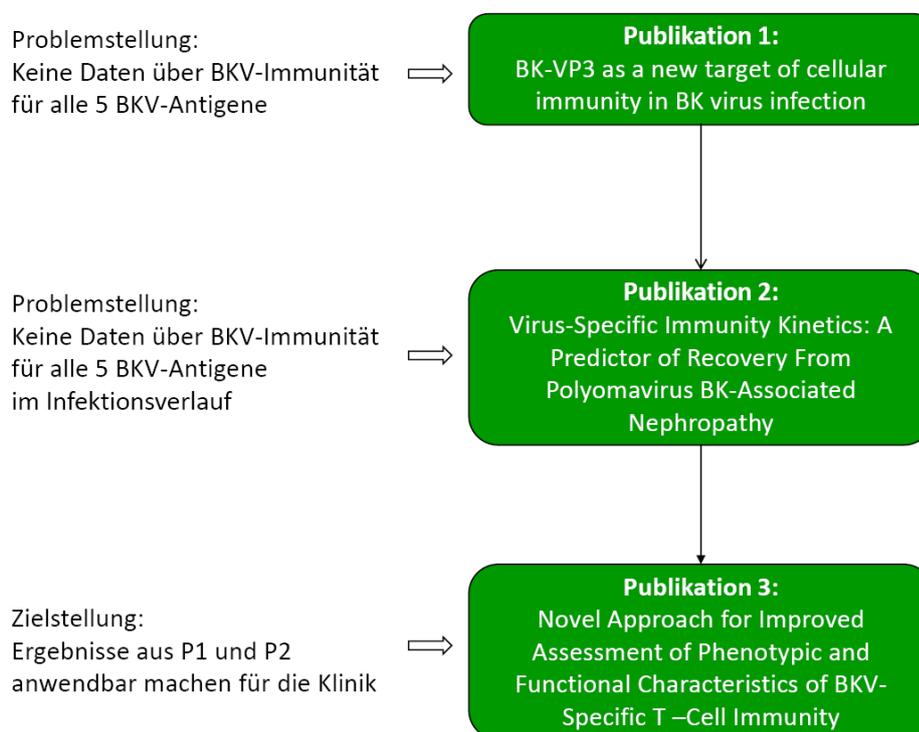


Abbildung 1: Übersicht über die Publikationen zur Dissertation

Publikation 1: **Mueller K**, Schachtner T, Sattler A, Meier S, Friedrich P, Trydzenskaya H, Hinrichs C, Trappe R, Thiel A, Reinke P, Babel N. BK-VP3 as a new target of cellular immunity in BK virus infection. *Transplantation* 2011; 91(1):100-7.

Publikation 2: Schachtner T, **Müller K**, Stein M, Diezemann C, Sefrin A, Babel N, Reinke P. BK Virus-Specific Immunity Kinetics: A Predictor of Recovery From Polyomavirus BK-Associated Nephropathy *Am J Transplant.* 2011; 11(11):2443-52.

Publikation 3: Trydzenskaya H, Sattler A, **Müller K**, Schachtner T, Dang-Heine C, Friedrich P, Nickel P, Hoerstrup J, Schindler R, Thiel A, Melzig MF, Reinke P, Babel N. Novel Approach for Improved Assessment of Phenotypic and Functional Characteristics of BKV-Specific T –Cell Immunity. *Transplantation* 2011; 92(11):1269-77.

2. Einleitung

Bei bis zu 50 Prozent nierentransplantierten Patienten führt die Infektion mit Polyomavirus BK (BKV) und die Progression zu Polyomavirus BK assoziierter Nephropathie (BKVN) zu einer Nierendysfunktion und zum Verlust der Niere. Somit stellt die Infektion mit BKV eine der schwerwiegendsten Komplikationen dar, die in der Posttransplantationsperiode auftreten können. Polyomavirus BK ist ein hüllenloses Virus, dessen DNA 5 Kilobasen kodiert. Das Genprodukt des Virus umfasst die frühen regulatorischen Proteine small t Antigen (st) und Large T Antigen (LT) sowie die späten Strukturproteine VP1, VP2 und VP3. Die weltweite Durchseuchung der Bevölkerung mit BKV beträgt 90 Prozent.

Das Auftreten von BKV Infektionen bei medikamentös supprimiertem Immunsystem nach einer Transplantation deutet auf eine starke Assoziation des Krankheitsverlaufs mit dem Immunstatus hin. Zudem wurde in den letzten Jahren eine Assoziation zwischen der Verwendung potenter Immunsuppressiva und dem Voranschreiten von BKV Infektionen hergestellt. Während Fälle von BKVN vor den 1980er Jahren kaum bekannt wurden, häuften sich diese im Zeitalter potenterer Immunsuppression. Diese Beobachtung liefert einen weiteren Hinweis auf die Beteiligung des geschwächten/unterdrückten Immunsystems an der progressiven BKV Infektion. So deuten neueste Erkenntnisse darauf hin, dass insbesondere die Schwächung der zellulären Immunantwort einen Risikofaktor und somit eine schlechtere Prognose für den Patienten darstellen¹⁻³.

Der Zusammenhang zwischen verminderter zellulärer Immunantwort und progressiver BKV Infektion wurde in mehreren Studien untersucht⁴⁻⁷. Das Design dieser Studien war jedoch limitiert – auf die Analyse der zellulären Immunität spezifisch für VP1 und LT. Die Immunantwort gegen die verbleibenden drei Proteine VP2, VP3 und st wurde bisher nicht untersucht.

Der Nachweis der BKV-spezifischen zellulären Immunität erfolgte bisher mittels sehr sensitiver Interferon Gamma (IFN γ)-ELISPOT-Methodik. Anhand dieser Methode lassen sich niedrigfrequente spezifische, IFN γ -produzierende Lymphozyten nachweisen. Jedoch besteht die größte Limitation bei der Verwendung dieser Methode darin, dass eine genaue Identifikation des jeweilig spezifisch reagierenden Zelltyps nicht möglich ist. Mittels polychromatischer durchflusszytometrischer Analysen (FACS – Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung) können anhand spezifischer extra- und intrazellulärer Marker mehrere Zelltypen parallel qualitativ und quantitativ analysiert werden.

Mit der vorliegenden Arbeit soll die Bedeutung der BKV-spezifischen Immunität für die BKV-Reaktivierung nach Nierentransplantationen beleuchtet werden.

3. Ziele

Die Ziele der vorliegenden Arbeit umfassen:

1. Untersuchung der Beteiligung zellulärer Immunität an der Pathogenese einer BKVN in einer retrospektiven Patientenstudie
 - Etablierung der polychromatischen Durchflusszyometrie zum qualitativen Nachweis von T-Zell-Antworten gegen alle 5 BKV-Proteine
 - Identifikation und Charakterisierung BKV-spezifischer T-Zell-Subpopulationen
 - Prüfung möglicher Korrelationen zwischen Schweregrad der BKV-Infektion und T-Zell-vermittelter Immunität
2. Untersuchung der BKV-spezifischen zellulären und humoralen Immunität während der Phasen der BKV-Reaktivierung
 - Prüfung möglicher Korrelationen zwischen dem Verlauf der BKV-Infektion und zellulärer- sowie humoraler Immunität
3. Etablierung einer zeit- und kostensparenden Methode für die Quantifizierung und Charakterisierung von BKV-spezifischen T-Zellantworten für eine schnelle Prognostizierung und therapeutische Intervention im Krankheitsverlauf

4. Methoden

4.1 Studiendesign

Das Monitoring der 48 Patienten für die erste Studie ('BK-VP3 as a New Target of Cellular Immunity in BK Virus Infection') erfolgte 1, 2, 3, 6, 9, und 12 Monate nach Transplantation sowie darauffolgend im Intervall von 3 Monaten durch Überwachung der BK Viruslast mittels quantitativer Real-Time PCR (qRT-PCR). Im Falle einer BKV Reaktivierung wurde die BK Viruslast im Abstand von 2 bis 4 Wochen untersucht. Die Diagnose von BKV assoziierter Nephropathie (BKVN) wurde in histologischen Untersuchungen der Nierenbiopsate abgesichert. Im Rahmen dieser retrospektiven Querschnittstudie erfolgte die Untersuchung der BKV-spezifischen zellulären Immunität nach der überstandenen BKV-Infektion bei nicht mehr nachweisbarer BK Viruslast. Im Rahmen der Longitudinalstudie 'BK Virus-Specific Immunity Kinetics: A Predictor of Recovery From Polyomavirus BK-Associated Nephropathy' wurden 18 Patienten mit BKV Reaktivierung/BKVN untersucht. Innerhalb der ersten 6 Monate nach der Transplantation wurde die BK Viruslast sowie die BKV-spezifische zelluläre Immunität monatlich parallel bestimmt, danach in einem Intervall von 3 Monaten und bei Auftreten einer BKV Reaktivierung wiederum monatlich. Für die Untersuchung der Stimulationswirkung von gemischten Overlapping Peptide Pools (MOPP) in 'Novel Approach for Improved Assessment of Phenotypic and Functional Characteristics of BKV-Specific T-Cell Immunity' wurden 27 Patienten mit BKV-Reaktivierung untersucht. Als Kontrollgruppe dienten 12 BKV-seropositive Patienten ohne BKV-Reaktivierung.

4.2 Quantitative Real-Time PCR zur Bestimmung der BK Viruslast

Die Bestimmung der BKV-Last erfolgte mittels qRT-PCR (Amplifikation eines Abschnitts des VP1-Gens) Dazu wurde DNA aus Patientenserum mithilfe des QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen Corp., Deutschland) aufgereinigt. Die Amplifikation der BKV-VP1-Region fand in einem Reaktionsvolumen von 25 μ L mit 900 nM Primer und 5 μ M Probe statt. Zur Bestimmung der Konzentration diente ein Plasmid mit BKV-VP1-Region als Standard. Die initiale Denaturierung erfolgte für 10 Minuten bei 95° C, gefolgt von 40 Zyklen (Denaturierung für 15 Sekunden bei 95° C, Annealing/Elongation für 1 Minute bei 60° C). Die Detektionsgrenze im linearen Bereich beträgt 1000 copies/mL.

4.3 Untersuchung der BKV spezifischen zellulären Immunantwort

Die Isolation der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) erfolgte im Rahmen aller vorliegenden Studien mittels Dichtegradientenzentrifugation von Vollblut (Antikoagulans

Lithium-Heparin) bei 300 x g über Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia Biotech AB, Schweden).

Für Studie 1 wurden die PBMC für die anschließende durchflusszytometrische Analyse in standardisierten Ansätzen mit je 1 µg/mL BKV Peptiden aus sogenannten Overlapping Peptide Pools (OPP) stimuliert. Ein Stimulationsansatz enthielt 5×10^6 PBMC in 1 mL RPMI-1640-Kulturmedium, supplementiert mit 2 mmol/L L-Glutamin, 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem humanen AB-Serum (Lonza, Schweiz), 50 µM β-Mercaptoethanol (Sigma, Deutschland), und 100 IU/mL Penicillin/Streptomycin (beide PAA, Österreich). Um das sekundäre Signal für eine ausreichende T-Zellstimulation zu verstärken, wurde zu dem Stimulationsansatz zusätzlich 1 µg/mL humaner anti-CD28-Antikörper (BD Pharmingen, USA) gegeben. Die Stimulation erfolgte für 6 Stunden bei 37° C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂. Für die intrazelluläre Anreicherung der ansonsten sezernierten Zytokine sowie CD154 wurde nach 2 Stunden Stimulationszeit 2 µg/mL Brefeldin A (BD Pharmingen, USA) zugegeben, welches den Golgi-vermittelten Proteintransport inhibiert. Als Positivkontrolle diente die Stimulation mit Staphylococcus Enterotoxin B (Sigma, Deutschland), die Negativkontrolle enthielt eine äquivalente Menge von humanem anti-CD28-Antikörper sowie Dimethylsulfoxid (DMSO), welches zum Auflösen der Peptide in den OPP verwendet wird.

Im Rahmen von Studie 3 erfolgte die Stimulation identisch, jedoch wurde zusätzlich mit einem Gemisch aller OPP (MOPP) stimuliert, so dass in einem Stimulationsansatz alle potentiellen BKV-Antigene in Form von 15-meren vorhanden waren. Die Endkonzentration eines jeden Peptids betrug 1 µg/mL.

Im Rahmen der Longitudinalstudie erfolgte die Stimulation zur Untersuchung der BKV-spezifischen Immunität abweichend von oben genannter Vorgehensweise. Da die zelluläre Immunität im Rahmen der Longitudinalstudie mittels IFN γ -ELISPOT quantifiziert wurde ist eine aktive Sezernierung von IFN γ nötig. Eine Zugabe von Brefeldin A ist daher nicht erforderlich. Die Stimulationsdauer betrug 24 Stunden bei 37°C.

4.4 Peptide zur BKV-spezifischen Stimulation

Für die antigenspezifische Stimulation der PBMC werden Peptidgemische (Overlapping Peptide Pools – OPP) eines jeweiligen Virusproteins verwendet. Peptidgemische bestehen aus kurzen Fragmenten der Virusproteine (15-meren), die sich in jeweils 11 Aminosäuren überlappen. Polyomavirus BK besteht aus fünf Proteinen – VP1, VP2, VP3, LT und st. Die Peptidgemische (nach SWISS-Prot Nummern der BKV-Antigene synthetisiert: VP1, P14996; VP2, P03094; VP3, P09034-2; st, P03082; und LT, P14999; JPT, Berlin) umspannen alle Fragmente eines jeweiligen Proteins, welche unter in vivo-Bedingungen durch die

endosomale Prozessierung in Antigenpräsentierenden Zellen (APC) entstehen können. Das bedeutet, dass unabhängig vom T-Zellrezeptor-Klonotyp alle T-Zellen, deren T-Zellrezeptor (TCR) spezifisch für ein beliebiges Epitop der BKV-Antigene ist, aktiviert werden können. Hier werden die T-Zellen ex vivo von APC stimuliert, welche die Peptide über den Major Histocompatibility Complex (MHC) präsentieren. Dabei werden sowohl CD4-positive T-Helferzellen als auch CD8-positive zytotoxische T-Zellen stimuliert, da sowohl die Präsentation über MHC-I (stimuliert CD8-positive T-Zellen) als auch über MHC-II (stimuliert CD4-positive T-Zellen) erfolgt. Ein weiterer Vorteil dieser Verfahrensweise besteht darin, dass die T-Zellen unabhängig vom HLA-Typ des Patienten stimuliert werden können. Die lyophilisierten Peptide werden in DMSO aufgelöst und in einer Endkonzentration von 1 µg/mL für die Stimulation eingesetzt. Im Rahmen von Studie 3 wurden die OPP als MOPP gemischt und in einer Endkonzentration von 1 µg/mL pro Peptid (5 µg/mL Gesamt-BKV-Protein) eingesetzt.

4.5 Polychromatische Durchflusszytometrie

Wie oben erwähnt, ermöglicht die polychromatische Durchflusszytometrie die parallele Analyse mehrerer Parameter auf Einzelzellebene. Hierzu werden die gewünschten Parameter extrazellulär und/oder intrazellulär Zellen mittels Fluorochrom-gekoppelter monoklonaler Antikörper markiert. Eine intrazelluläre Färbung benötigt eine Permeabilisierung der Zellmembran, während Oberflächenmarker extrazellulär ohne Permeabilisierung gefärbt werden können. Im Rahmen von Studie 1 und Studie 3 wurden die lebenden Zellen mit einem fixierungs-/permeabilisierungsstabilem Lebend/Tot-Farbstoff angefärbt (LIVE/DEAD Fixable Aqua dead cell stain kit; Invitrogen, USA). Anschließend wurden die Oberflächenmarker CD3, CD8 und CD69 gefärbt. Nach einem Fixierungs- und Permeabilisierungsschritt wurden die intrazellulären Marker CD154 (CD40 Ligand), Interleukin 2 (IL-2), Interferon Gamma (IFN γ), Tumornekrosefaktor α (TNF α) und Interleukin 17 (IL-17) gefärbt. Alle Färbeschritte erfolgten unter Zugabe von 2 µg/mL humanem Immunglobulin (Beriglobin, CSL Behring) um Fc-Gamma-Rezeptoren abzusättigen und somit unspezifische Markierungen zu verhindern. Die Zellen wurden mittels eines LSRII Durchflusszytometers (BD, USA) hinsichtlich Größe, Granularität und Fluoreszenz gemessen und mit der Software FlowJo (TreeStar, USA) ausgewertet. Das Hintergrundsignal der Negativkontrolle wurde vom BKV-spezifischen Signal subtrahiert. Ein Signal ist als positiv definiert, wenn der Prozentsatz der zytokinproduzierenden Zellen $\geq 0.001\%$ von CD4-positiven bzw. CD8-positiven T-Zellen ist; unter der Voraussetzung, dass sich nach der Subtraktion des Hintergrundsignals noch mindestens 15 Zellen im jeweiligen Gate befinden.

4.6 Enzyme Linked Immunospot Technique (ELISPOT)

Mittels ELISPOT wird die Anzahl zytokinsezernierender (hier: IFN γ) Zellen in einem Zellgemisch bestimmt. Hierfür wird anti humaner IFN γ -Antikörper (3 μ g/mL, Endogen, USA) über Nacht auf den Boden der Löcher von 96-Loch-Platten gebunden. $2,5 \times 10^5$ PBMC werden pro Loch ausgesät und mit 1 μ g/mL BKV OPP in RPMI-1640 für 24 Stunden bei 37° C stimuliert. Als Positivkontrolle diene hier ebenfalls die Stimulation mit 1 μ g/mL Staphylococcus Enterotoxin B, als Negativkontrolle diene DMSO. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Platten bei 4° C über Nacht mit 1 μ L/mL biotiniertem IFN γ -Detektionsantikörper (Endogen, USA). Nach der Zugabe von Streptavidin (1 μ g/mL) für 2 Stunden bei Raumtemperatur wurden die zytokinsezernierenden Zellen als Spots unter Zugabe von 200 μ L AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol, Sigma, Deutschland) sichtbar gemacht. Die Spots wurden computerbasiert ausgezählt (Immunospot, Cellular Technologies, Ltd., USA). Ein positives Signal im ELISPOT wurde als ≥ 10 Spot Forming Units (SFU) pro Loch nach Abzug der Negativkontrolle definiert.

4.7 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) zum Nachweis BKV-spezifischer Antikörper

BKV-spezifisches IgM and IgG wurden anhand ihrer Bindung an synthetisierte BKV-VP1-Virus-like particles (VLP) und Meerrettich-Peroxidase-Reaktion nachgewiesen. Die optische Dichte bei 405 nm wurde an einem ELISA-Reader gemessen. Als Detektionsgrenze wurden eine OD_{405 nm} <0,16 (IgM) und <0,18 (IgG) definiert.

4.8 Statistische Analysen

Statistische Analysen wurden mittels SPSS Version 16 (SPSS Inc., USA) durchgeführt. Der Vergleich von Patientengruppen erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test und Mann-Whitney-U-Test für nicht-parametrische unabhängige Proben. Vergleiche zwischen gepaarten Proben wurden mittels Friedman-Test und Wilcoxon-Rangsummen-Test für nicht-parametrische abhängige Proben durchgeführt. P-Werte < 0,05 werden als statistisch signifikant gewertet. Die Abbildungen zeigen Box-Plots mit Median und Interquartil-Reichweite.

5. Ergebnisse

5.1 Publikation 1:

Untersuchung der Beteiligung zellulärer Immunität an der Pathogenese einer BKVN in einer retrospektiven Patientenstudie – als Originalarbeit veröffentlicht unter ‘*BK-VP3 as a New Target of Cellular Immunity in BK Virus Infection*‘

In den letzten Jahren wurde eine Assoziation zwischen dem Fehlen der zellulären Immunität und dem Voranschreiten von BKV-Infektionen beschrieben. Die zugrundeliegenden Studien waren jedoch limitiert auf die Untersuchung zweier von fünf BKV-Antigenen. Hier ermöglicht die Etablierung der polychromatischen Durchflusszytometrie erstmalig den qualitativen Nachweis von T-Zell-Antworten gegen alle 5 BKV-Proteine. Dazu wurden in einer retrospektiven Studie die T-Zellen nierentransplantierter Patienten mit Zustand nach BKV-Reaktivierung und ohne BKV Reaktivierung untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass alle 5 BKV-Proteine eine T-Zell-vermittelte Immunantwort auslösen (Abb. 1A). Demnach waren T-Zellen gegen ein beliebiges BKV-Antigen bei 100 Prozent der Patienten mit durchgemachter BKVN detektierbar; bei 74 Prozent der Patienten waren T-Zellen gegen alle BKV-Antigene nachweisbar. Die BKV-spezifische Immunantwort wurde hierbei von CD4-positiven T-Zellen dominiert (Abb. 1A) und die Schwere der BKV-Infektion korrelierte mit der Frequenz der BKV-spezifischen CD4-positiven T-Zellen. So wurden bei Patienten mit einem schweren Krankheitsverlauf (Progression zu BKVN) signifikant erhöhte Frequenzen BKV-spezifischer CD4-positive Interferon-Gamma- bzw. Interleukin-2-Einzelproduzenten nachgewiesen (Abb. 2) als bei Patienten der Kontrollgruppe (keine Reaktivierung). Multifunktionelle T-Zellen, die gleichzeitig Interleukin-2, Interferon-Gamma und Tumornekrosefaktor-Alpha produzieren, werden in der Literatur als protektiv gegen eine Progression von Virusinfektionen beschrieben. Diese multifunktionellen T-Zellen wurden vermehrt bei Patienten aus der Kontrollgruppe (keine Progression zu BKVN) detektiert (Abb. 3).

Eine weitere interessante Beobachtung betrifft die Antigenspezifität der BKV-spezifischen T-Zellen. Während VP3 bei allen der Patienten mit Progression zu BKVN eine T-Zell-vermittelte Immunantwort auslöst, ist dies bei VP1 und LT Antigen – den beiden in der Vergangenheit untersuchten BKV-Antigenen – nicht der Fall (Abb. 1A). So waren VP3-spezifische T-Zellen bei zwei Patienten ohne VP1- und LT-spezifische T-Zellen nachweisbar.

Die Frequenz dieser VP3-spezifischen Immunantwort war zudem größer als die Immunantwort gegenüber allen anderen BKV-Antigenen (Abb. 1B-D).

5.2 Publikation 2:

Untersuchung der BKV-spezifischen zellulären und humoralen Immunität im Verlauf der BKV-Infektion – als Originalarbeit veröffentlicht unter ‘*BK Virus-Specific Immunity Kinetics: A Predictor of Recovery From Polyomavirus BK-Associated Nephropathy*‘

Während frühere Studien auf eine Assoziation zwischen der Entwicklung BKV-spezifischer zellulärer Immunität und der Resolution von BKV-Infektionen hinweisen, gibt es bisher jedoch noch keine immunologischen Parameter, um Risikopatienten zu identifizieren bzw. den Ausgang einer BKV-Infektion vorherzusagen. Um einen Einblick in die Dynamik der zellulären und humoralen Immunität während einer BKV-Infektion zu erlangen, wurden T-Zellen und Antikörper von Patienten mit Progression zu BKVN sowie Patienten mit selbstlimitierter BKV-Infektion analysiert.

Es konnte gezeigt werden, dass die BKV-spezifische zelluläre Immunität gegen alle fünf BKV-Antigene im zeitlichen Verlauf von Diagnose zu Resolution der BKV-Infektion signifikant steigt (Abb. 2). Die ersten BKV-spezifischen T-Zellen bei Patienten mit selbstlimitierter BKV-Infektion wurden einen Monat nach Diagnose der BKV-Reaktivierung nachgewiesen. Bei Patienten mit Progression zu BKVN wurden BKV-spezifische T-Zellen erst fünf Monate nach Diagnose der BKV-Reaktivierung und ausschließlich nach Reduzierung der Immunsuppression nachgewiesen. Die höchste Frequenz BKV-spezifischer T-Zellen wurde bei beiden Patientengruppen zum Zeitpunkt der Resolution der BKV-Infektion gemessen (Abb. 2). Hierbei wurden bei Patienten mit Progression zu BKVN antigenunabhängig signifikant höhere T-Zell-Frequenzen nachgewiesen als bei Patienten mit selbstlimitierter BKV-Infektion (SFU/10⁶ PBMC [Gruppe 1/Gruppe2]: VP1 225/88, VP2 140/67, VP3 150/78, st 170/49, LT 160/104). Die Frequenzen der T-Zellen bei Patienten mit BKVN waren auch 6 Monate nach der Resolution der BKV-Reaktivierung signifikant erhöht gegenüber den T-Zellen der Patienten mit selbstlimitierter BKV-Infektion (SFU/10⁶ PBMC [Gruppe 1/Gruppe2]: VP1 160/70, VP2 100/30, VP3 125/25, st 80/20, LT 100/40) (Abb. 2).

T-Zellen spezifisch für die Strukturproteine VP1-VP3 wurden bei 67 Prozent der Patienten früher nachgewiesen als jene für die regulatorischen Proteine st- und LT-Antigen; bei 33 Prozent der Patienten erfolgte der Nachweis zeitgleich (Abb. 3). Bei einem Patienten mit

Progression zu BKVN (Patient 7) konnten über die gesamte Infektionsdauer keine T-Zellen gegen regulatorische BKV-Antigene nachgewiesen werden. Bei diesem Patienten blieb die Viruslast stabil erhöht bei 2×10^4 bis 7×10^4 Kopien/mL.

Neben der höchsten Frequenz BKV-spezifischer T-Zellen war bei Patienten mit BKVN auch die größte Zunahme BKV-spezifischer IgG-AK von Diagnose zu Resolution der BKV-Infektion zu verzeichnen (0,888 OD bzw. 1,691 OD); IgM-Level waren während der Infektion dauerhaft erhöht (Diagnose: 1,342 OD, Resolution: 0,803 OD) gegenüber dem Wert vor BKV-Reaktivierung (0,340 OD) (Abb. 4).

5.3 Publikation 3:

Etablierung einer zeit- und kostensparenden Methode für die Quantifizierung und Qualifizierung von BKV-spezifischen T-Zellantworten für eine schnelle Prognostizierung und therapeutische Intervention im Krankheitsverlauf – als Originalarbeit veröffentlicht unter ‘*Novel Approach for Improved Assessment of Phenotypic and Functional Characteristics of BKV-Specific T –Cell Immunity*‘

Die Daten unserer vorherigen Studien belegen, dass die Messung von T-Zellen spezifisch für VP1 und LT-Antigen nicht ausreicht, um die gesamte BKV-spezifische zelluläre Immunantwort zu erfassen. Unsere bisherige Vorgehensweise, alle fünf BKV-Antigene separat zur Stimulation einzusetzen, liefert demnach die höchstauflösenden Ergebnisse bezüglich der BKV-Antigenspezifität. Um Zeit, Kosten und nicht zuletzt auch benötigte Mengen an Blut einzusparen, adaptierten wir den vorher entwickelten polychromatischen durchflusszytometrischen Assay. Nun führten wir die Stimulation der T-Zellen mit einem Gemisch aller BKV-Antigene in einem Ansatz durch. BKV-spezifische T-Zellen von Patienten mit durchlebter/aktueller BKV-Infektion und von Patienten ohne BKV-Reaktivierung wurden analysiert.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit allen fünf BKV-Antigenen gleichzeitig (MOPP) in allen Patientengruppen eine höhere T-Zellantwort hervorruft als die Stimulation mit den jeweiligen Antigenen allein (SOPP) und zwar unabhängig davon, ob IFN γ , IL-2 oder TNF-a gemessen wurden (Abb. 1). Außerdem konnten mit MOPP-Stimulation BKV-spezifische T-Zellen auch bei denjenigen Patienten nachgewiesen werden, die nach SOPP-Stimulation keine T-Zell-Aktivität zeigten. So wurden nach MOPP-Stimulation unabhängig von analysiertem Zytokin und Patientengruppe jeweils bei 100 Prozent der Patienten T-Zellen nachgewiesen, während nach SOPP-Stimulation bei

null Prozent (z.B. LT/ IFN γ /Gruppe 1) bis 100 Prozent (LT/IL-2/Gruppe 2) der Patienten T-Zellen nachgewiesen werden konnten.

Der Nachweis und die Charakterisierung der in niedriger Frequenz vorhandenen CD8-positiven T-Zellen war durch den neuen Ansatz ebenso möglich wie die Analyse der CD4-positiven T-Zellen (Abb. 1; 2). Dabei wurde ersichtlich, dass die CD8-T-Zellantwort in allen Patientengruppen von IFN-produzierenden T-Zellen dominiert wird (Abb. 2) während IL-17-Produktion weder in CD4-positiven noch in CD8-positiven T-Zellen nachweisbar war.

Interessanterweise zeigten Patienten mit einer schnellen Resolution der BKV-Reaktivierung signifikant höhere Frequenzen multifunktioneller IFN γ /IL-2/TNF α - und IL-2/TNF α -produzierender CD4-positiver T-Zellen gegenüber den Patienten mit einem schweren, längeren Infektionsverlauf ($44/10^6$ PBMC gegenüber $170/10^6$ PBMC, $p < 0,05$; Abb. 3B).

6. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mittels verschiedener Studien Untersuchungen der BKV-spezifischen Immunität durchgeführt. Assoziationen zwischen dem Fehlen BKV-spezifischer T-Zellen und dem Voranschreiten von BKV-Infektionen wurden in früheren Studien demonstriert⁴⁻¹¹ und konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. So kam es ausschließlich nach der Rekonstitution BKV-spezifischer T-Zellen zum Absinken der BKV-Viruslast. Die Dynamik einer BKV-Infektion lässt sich vereinfacht in schwere Verläufe (erhöhte Viruslast über einen Zeitraum von mindestens drei Monaten, Anstieg von Serum-Kreatinin, Progression zu BKVN) und leichte Verläufe (transiente, selbstlimitierte Infektionen, ohne Erhöhung von Serum-Kreatinin) einteilen. Ein schwerer Verlauf war bei den hier untersuchten Patienten nicht ohne therapeutische Intervention (Umstellung der Immunsuppression) aufzuhalten. Doch welche immunologischen Marker können zur Überprüfung des BKV-Immunistatus bzw. zur Vorhersage des Krankheitsverlaufs herangezogen werden?

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst ein polychromatisches Durchflusszytometrieverfahren zum Nachweis niedrigfrequenter BKV-spezifischer T-Zellen entwickelt. Die qualitative und quantitative Analyse der T-Zellen sollte sich hierbei nicht auf bisher untersuchte Spezifitäten (LT-Antigen, VP1) beschränken sondern alle BKV-Antigene abdecken.

Wir zeigen hier, dass die gesamte BKV-spezifische Immunität nicht durch die beiden Antigene LT-Antigen und VP1 repräsentiert werden kann, sondern eine Messung aller BKV-Antigene verlangt. So zeigte sich in unserer ersten Studie, dass die Antigenpezifität innerhalb der verschiedenen Patienten sehr variabel ist und das Vorhandensein von VP1/LT-Antigen-spezifischen T-Zellen nicht das Vorhandensein von T-Zellen gegen die anderen Struktur-(VP2, VP3) bzw. regulatorischen Proteine vorhersagt. Im Gegenteil; es existierten T-Zellen gegen VP3 in Patienten, die keine T-Zellen gegen LT-Antigen/VP1 hatten. Das bedeutet, dass die Messung der zellulären Immunität spezifisch für VP1 und LT nicht ausreicht, um die komplette BKV-spezifische Immunantwort zu erfassen. Aufgrund dieser Beobachtung wurde in den nachfolgenden Studien die BKV-Immunität gegen alle fünf BKV-Antigene untersucht und übereinstimmende Beobachtungen gemacht.

In der Verlaufsstudie konnte eine Zunahme BKV-spezifischer T-Zellen im Verlauf von Diagnose zu Resolution der BKV-Infektion dokumentiert werden. Dabei hob sich keine Spezifität gegen ein bestimmtes BKV-Antigen zu einem Zeitpunkt im Verlauf der BKV-

Infektion signifikant heraus. Jedoch wurde beobachtet, dass sich T-Zellen gegen Strukturproteine vor den T-Zellen gegen regulatorische Proteine etablieren. Interessanterweise blieb die Viruslast bei einem Patienten, obwohl T-Zellen gegen BKV-Strukturproteine jedoch keine T-Zellen gegen regulatorische BKV-Proteine nachweisbar waren, stabil auf erhöhtem Niveau. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Etablierung von T-Zellen gegen Strukturproteine für einen Rückgang der BK Viruslast nötig ist, eine vollständige Resolution der BV-Infektion aber nur ermöglicht wird, wenn auch T-Zellen gegen regulatorische BKV-Antigene etabliert werden. Übereinstimmend berichteten Comoli et al. über einen Zusammenhang zwischen dem Fehlen einer T-Zell-Antwort gegen die regulatorischen BKV-Antigene und einem Risiko für BKV-Reaktivierung¹¹.

Eine weitere interessante Erkenntnis der qualitativen Analysen der BKV-spezifischen Immunantwort war die Dominanz von CD4-positiven T-Zellen bzw. Abwesenheit von CD8-positiven T-Zellen in der ersten Studie. So waren mit einer Einzelantigen-Stimulation keine CD8-positiven T-Zellen nachweisbar. Die Stimulation mit MOPP in der dritten Studie erhöhte die Sensitivität des Assays und ermöglichte uns den Nachweis von BKV-spezifischen CD8-positiven T-Zellen. Hier zeigte sich eine Dominanz von IFN γ -produzierenden T-Zellen innerhalb der CD8-positiven T-Zellen und übereinstimmend mit den Ergebnissen aus der ersten Studie eine allgemeine Dominanz von CD4-positiven T-Zellen. Innerhalb dieser CD4-positiven T-Zellen finden sich auch multifunktionelle IFN γ /IL-2/TNF α -produzierende T-Zellen. Diese konnten in der ersten und dritten Studie übereinstimmend in höherer Frequenz bei den Patienten nachgewiesen werden, die einen leichteren Krankheitsverlauf haben. Damit übereinstimmend werden multifunktionelle T-Zellen in der Literatur als protektiv bei Viruserkrankungen beschrieben^{12, 13}. Geht man von einer hohen Variabilität der Antigenspezifität aus, wie wir sie hier detektiert haben, erschwert dies die Identifikation eines universellen Markers für die Vorhersage des Verlaufs einer BKV-Infektion. Das Vorhandensein multifunktionaler T-Zellen könnte einen solchen Marker darstellen.

7. Schlussfolgerung und Ausblick

Wir konnten zeigen, dass unter der immunsuppressiven Therapie der Verlauf der BKV-Reaktivierung und die Schwere der BKV-Infektion vom Vorhandensein zellulärer Immunität, ihrer Quantität und der Art der T-Zellen abhängig sind.

Bis jetzt ist jedoch noch nicht klar, mit welcher immunsuppressiven Medikation die bessere Prognose einer aktiven BKV-Infektion assoziiert ist. In diesem Zusammenhang wären weitere prospektive Studien, die im Verlauf aktiver BKV-Infektionen eine Modifizierung der Immunsuppression beinhalten, von großer klinischer Relevanz. Im Rahmen dieser Studien könnte analysiert werden, in wie weit die Art der Immunsuppression die Rekonstitution der T-Zellen beeinflusst und ob man selektiv bestimmte Subklassen von T-Zellen (z. B. multifunktionelle BKV-spezifische T-Zellen) induzieren kann. Somit könnten Aussagen über die Beeinflussbarkeit des Krankheitsverlaufs mit spezieller medikamentöser Therapie getroffen werden.

Des Weiteren können BKV-spezifische T-Zellen mittels MACS- und FACS-Technologie aufgereinigt werden, um diese für den Ansatz der adoptiven T-Zelltherapie nutzbar zu machen. Hierfür könnte man sich an etablierten Protokollen zur Expansion Viruspezifischer T-Zellen, wie bereits für Epstein-Barr-Virus und Zytomegalievirus beschrieben, orientieren¹⁴. Für diesen Ansatz empfiehlt sich insbesondere eine Stimulierung mit allen BKV-Antigenen, repräsentiert durch den gemischten Peptidpool wie in der 3. Studie beschrieben ist. Mit einer Stimulation mit gemischtem Peptidpool werden alle theoretisch vorhandenen Epitope der Antigene abgedeckt und die Ausbeute der Zellzahl maximiert. Auf diese Weise wird diese wichtigste Limitierung der Generierung von Virus-spezifischen T-Zellen beseitigt.

Ein interessanter Ansatz wäre auch, in den wie oben beschrieben hergestellten T-Zell-Linien die T-Zellrezeptoren zu sequenzieren bzw. deren Spezifität durch ein Epitopmapping zu ermitteln. Daraus könnten sich weitere Möglichkeiten bis hin zur Vakzinierung ergeben.

8. Literaturreferenzen

Es werden die für die Zusammenfassung verwendeten Referenzen aufgeführt. Weitere Literaturreferenzen können den publizierten Arbeiten entnommen werden.

Für die Dissertation verwendete eigene Publikationen (Originalartikel):

- (1) **Mueller K**, Schachtner T, Sattler A, Meier S, Friedrich P, Trydzenskaya H, Hinrichs C, Trappe R, Thiel A, Reinke P, Babel N. BK-VP3 as a new target of cellular immunity in BK virus infection. *Transplantation* 2011; 91(1):100-7.
- (2) Schachtner T, **Müller K**, Stein M, Diezemann C, Seifrin A, Babel N, Reinke P. BK Virus-Specific Immunity Kinetics: A Predictor of Recovery From Polyomavirus BK-Associated Nephropathy *Am J Transplant*. 2011; 11(11):2443-52.
- (3) Trydzenskaya H, Sattler A, **Müller K**, Schachtner T, Dang-Heine C, Friedrich P, Nickel P, Hoerstrup J, Schindler R, Thiel A, Melzig MF, Reinke P, Babel N. Novel Approach for Improved Assessment of Phenotypic and Functional Characteristics of BKV-Specific T-Cell Immunity. *Transplantation* 2011; 92(11):1269-77.

Für die Zusammenfassung verwendete Referenzen:

1. Hirsch HH, Steiger J. Polyomavirus BK. *Lancet Infect Dis* 2003; 3: 611.
2. Hirsch HH. BK virus: Opportunity makes a pathogen. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 354.
3. Hirsch HH. Virus infections post transplant: Risk and immunity. *Transpl Infect Dis* 2005; 7: 97.
4. Binggeli S, Egli A, Dickenmann M, Binet I, Steiger J, Hirsch HH. BKV replication and cellular immune responses in renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2006; 6: 2218–2219.
5. Comoli P, Binggeli S, Ginevri F, Hirsch HH. Polyomavirus associated nephropathy: Update on BK virus-specific immunity. *Transpl Infect Dis* 2006; 8: 86–94.
6. Ginevri F, Azzi A, Hirsch HH, et al. Prospective monitoring of polyomavirus BK replication and impact of preemptive intervention in pediatric kidney recipients. *Am J Transplant* 2007; 7: 2727–2735.
7. Bohl DL, Brennan DC. BK virus nephropathy and kidney transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2007; Suppl 1:S36-46.
8. Binggeli S, Egli A, Schaub S, et al. Polyomavirus BK-specific cellular immune response to VP1 and large T-antigen in kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2007; 7: 1131.
9. Randhawa PS, Popescu I, Macedo C, et al. Detection of CD8+-T-cells sensitized to BK virus large T antigen in healthy volunteers and kidney transplant recipients. *Hum Immunol* 2006; 67: 298.
10. Hammer MH, Brestrich G, Andree H, et al. HLA type-independent method to monitor polyoma BK virus-specific CD4 and CD8 T-cell immunity. *Am J Transplant* 2006; 6: 625.

11. Comoli P, Hirsch HH, Ginevri F. Cellular immune responses to BK virus. *Curr Opin Organ Transplant* 2009; 13: 569.
12. Harari A, Vallelian F, Meylan PR, et al. Functional heterogeneity of memory CD4 T-cell responses in different conditions of antigen exposure and persistence. *J Immunol* 2005; 174: 1037.
13. Duvall MG, Precopio ML, Ambrozak DA, et al. Polyfunctional T-cell responses are a hallmark of HIV-2 infection. *Eur J Immunol* 2008; 38: 350.
14. Brestrich G, Zwinger S, Fischer A, Schmück M, Röhmhild A, Hammer MH, Kurtz A, Uharek L, Knosalla C, Lehmkuhl H, Volk HD, Reinke P. Adoptive T-cell therapy of a lung transplanted patient with severe CMV disease and resistance to antiviral therapy. *Am J Transplant* 2009; 9(7):1679-84.

9. Anteilserklärung

Publikation 1: **Mueller K**, Schachtner T, Sattler A, Meier S, Friedrich P, Trydzenskaya H, Hinrichs C, Trappe R, Thiel A, Reinke P, Babel N. **BK-VP3 as a new target of cellular immunity in BK virus infection. Transplantation** 2011; 91(1):100-7.

Impact Factor 2011: 4,003

85 Prozent; Experimentelles Design, Durchführung der meisten Experimente, Analyse und Auswertung der Daten, Anfertigen des Manuskripts

Publikation 2: Schachtner T, **Müller K**, Stein M, Diezemann C, Sefrin A, Babel N, Reinke P. **BK Virus-Specific Immunity Kinetics: A Predictor of Recovery From Polyomavirus BK-Associated Nephropathy. Am J Transplant.** 2011; 11(11):2443-52.

Impact Factor 2011: 6,394

10 Prozent; Durchführung von Experimenten, Besprechung von Analyse und Auswertung der Daten

Publikation 3: Trydzenskaya H, Sattler A, **Müller K**, Schachtner T, Dang-Heine C, Friedrich P, Nickel P, Hoerstrup J, Schindler R, Thiel A, Melzig MF, Reinke P, Babel N. **Novel Approach for Improved Assessment of Phenotypic and Functional Characteristics of BKV-Specific T –Cell Immunity. Transplantation** 2011; 92(11):1269-77.

Impact Factor 2011: 4,003

20 Prozent; Durchführung von Experimenten, Hilfe bei Auswertung und Analyse der Daten, Assistenz beim Anfertigen des Manuskripts

10. Druckexemplare der ausgewählten Publikationen

Publikation 1:

Mueller K, Schachtner T, Sattler A, Meier S, Friedrich P, Trydzenskaya H, Hinrichs C, Trappe R, Thiel A, Reinke P, Babel N. **BK-VP3 as a new target of cellular immunity in BK virus infection.** Transplantation 2011; 91(1):100-7.

Publikation 2:

Schachtner T, **Müller K**, Stein M, Diezemann C, Sefrin A, Babel N, Reinke P. **BK Virus-Specific Immunity Kinetics: A Predictor of Recovery From Polyomavirus BK-Associated Nephropathy** Am J Transplant. 2011; 11(11):2443-52.

Publikation 3:

Trydzenskaya H, Sattler A, **Müller K**, Schachtner T, Dang-Heine C, Friedrich P, Nickel P, Hoerstrup J, Schindler R, Thiel A, Melzig MF, Reinke P, Babel N. **Novel Approach for Improved Assessment of Phenotypic and Functional Characteristics of BKV-Specific T –Cell Immunity.** Transplantation 2011; 92(11):1269-77.

11. Lebenslauf

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

12. Publikationsliste

Originalartikel:

Brandt C, Liman P, Bendfeldt H, **Mueller K**, Reinke P, Radbruch A, Worm M, Baumgrass R.: *Whole blood flow cytometric measurement of NFATc1 and IL-2 expression to analyze cyclosporine A-mediated effects in T cells.* Cytometry A. 2010 Jul;77(7):607-13. Impact Factor: 3,729

Mueller K, Schachtner T, Sattler A, Meier S, Friedrich P, Trydzenskaya H, Hinrichs C, Trappe R, Thiel A, Reinke P, Babel N. *BK-VP3 as a new target of cellular immunity in BK virus infection.* Transplantation 2011; 91(1):100-7. Impact Factor: 4,003

Schachtner T, **Müller K**, Stein M, Diezemann C, Sefrin A, Babel N, Reinke P. *BK Virus-Specific Immunity Kinetics: A Predictor of Recovery From Polyomavirus BK-Associated Nephropathy* Am J Transplant. 2011; 11(11):2443-52. Impact Factor: 6,394

Trydzenskaya H, Sattler A, **Müller K**, Schachtner T, Dang-Heine C, Friedrich P, Nickel P, Hoerstrup J, Schindler R, Thiel A, Melzig MF, Reinke P, Babel N. *Novel Approach for Improved Assessment of Phenotypic and Functional Characteristics of BKV-Specific T –Cell Immunity.* Transplantation 2011; 92(11):1269-77. Impact Factor: 4,003

Schmueck M, Fischer AM, Hammoud B, Brestrich G, Fuehrer H, Luu SH, **Mueller K**, Babel N, Volk HD and Reinke P. *Preferential expansion of human virus-specific multifunctional central-memory T cells by partial targeting the IL-2 receptor signaling pathway – the key role of CD4+ T cells.* J Immunol. 2012; 188:5189-5198 Impact Factor: 5,745

Thomas Schachtner, **Karin Mueller**, Maik Stein, Anett Sefrin, Nina Babel, Petra Reinke: *Five BKV Antigens Show Antigenic Properties in Kidney Transplant Recipients with Polyomavirus BK-associated Nephropathy.* Eingereicht bei American Journal of Transplantation.

Vorträge und Poster:

XII Basic Science Symposium / II ESOT Basic Science Meeting 2011, Boston

Poster; Erst-Autorenschaft: *‘New marker of BKV specific cellular immunity for prediction of clinical outcome in posttransplant BKV infection.’*

American Transplant Congress 2010, San Diego

Vortrag; Co-Autorenschaft: *‘Kinetics of Polyomavirus BK-Specific Humoral and Cellular Immunity in the First Year after Kidney Transplantation Correlate with Intensity of BKV-Infection.’*

Poster; Erst-Autorenschaft: *‘BKV-specific IFN γ -producing CD4/CD8-positive T cells might*

determine the clinical outcome of BKV infection in renal transplant patients.' (awarded)

Poster; Co-Autorenschaften:

'Recovery of Polyomavirus BK-Specific Cellular and Humoral Immunity as a Predictor of Therapeutic Efficiency and Recovery from BKV-Associated Nephropathy.'

'Impaired Class Switching to BKV-Specific Immunoglobulin G Might Be Critical for the Development of Polyomavirus BK-Associated Nephropathy.'

'Increased Expression of PD1 and PD1-L Might Be Involved into the Pathogenesis of BKV-Associated Nephropathy in Renal Transplant Patients.'

'Evaluation of Safety and Efficacy of H1N1 Swine-Origin Influenza A Vaccination in Renal Transplant Patients.'

XXIII International Congress of the Transplantation Society 2010, Vancouver

Vortrag; Co-Autorenschaft: *'New Protocol of BKV-specific T cell analysis allows for approved assessment of phenotypic and functional characteristics of BKV-specific immunity.'*

14th International Congress of Immunology 2010 , Kobe

Vortrag; Co-Autorenschaft: *'New Protocol of BKV-specific T cell analysis allows for approved assessment of phenotypic and functional characteristics of BKV-specific immunity.'*

American Transplant Congress 2009, Boston

Vortrag; Erst-Autorenschaft: *'VP3-specific Multifunctional CD4-positive T cells as a new Marker of cellular Immunity in Patients with BKV-Associated Nephropathy'*

Vortrag; Co-Autorenschaft: *'Immunodominant VP1 and 4 other subdominant antigens as important targets of BKV-specific immunity in KT patients with BKV infection'*

13. Selbständigkeitserklärung

„Ich, Müller, Karin, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchung der zellulären und molekularen Mechanismen der Polyomavirus-spezifischen Immunantwort bei Patienten nach Nierentransplantation“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

14. Abkürzungsverzeichnis

APC	– Antigen Presenting Cells (Antigenpräsentierende Zelle)
BKV	– Polyomavirus BK
BKVN	– BKV assoziierte Nephropathie
CD	– Cluster of Differentiation
DMSO	– Dimethylsulfoxid
DNA	– Deoxy Ribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
ELISA	– Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ELISPOT	– Enzyme Linked Immuno Spot Assay
FACS	– Fluorescence activated cell sorting
IFN γ	– Interferon Gamma
IL	– Interleukin
LT	– Large T Antigen
MHC	– Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MOPP	– Mixed Overlapping Peptide Pool
MACS	– Magnet activated cell sorting
OPP	– Overlapping Peptide Pool
PBMC	– Peripheral Blood Mononuclear Cells (periphere mononukleäre Blutzellen)
qRT-PCR	– quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction (quantitative Real Time Polymerasekettenreaktion)
SFU	– Spot Forming Units
SOPP	– Single Overlapping Peptide Pool
st	– small t Antigen
TCR	– T Cell Receptor (T-Zellrezeptor)
TNF α	– Tumornekrosefaktor Alpha
T-Zelle	– Thymus Zelle, Thymus Lymphozyt
VLP	– Virus Like Particles
VP	– Virusprotein

15. Danksagung

Herzlicher Dank gebührt vielen Menschen, die mich während der Durchführung der Doktorarbeit begleitet und unterstützt haben.

Zuerst möchte ich meiner Betreuerin PD Dr. med. Nina Babel meinen Dank aussprechen. Ihre Fachkompetenz und stets zuversichtliche Einstellung haben zu einer besonders bereichernden Zusammenarbeit geführt. Vielen Dank auch für das immer offene Ohr und die große Hilfsbereitschaft wenn es um familiäre medizinische Fragen ging! Das war und ist von unschätzbarem Wert für mich und meine Familie und hat uns so einige Sorgen genommen.

Vielen Dank an Prof. Dr. med. Petra Reinke und Prof. Dr. med. Hans Dieter Volk für die Möglichkeit, die Promotion an ihren Einrichtungen in der Charité durchführen zu können. Ebenso gebührt Dank Prof. Dr. rer. nat. Andreas Radbruch und Prof. Dr. rer. nat. Andreas Thiel für die Möglichkeit auch auf Ressourcen im Deutschen Rheumaforschungszentrum zurückgreifen zu können.

Meinen Kollegen in Charité und Deutschem Rheumaforschungszentrum möchte ich für die fachlichen und außerfachlichen Diskussionen und Beiträge danken. Es ist schön, dass viele Einzelkämpfer auch zu einem Team werden können; hier sind viele wertvolle Freundschaften entstanden.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken. Wir haben viele Schwierigkeiten gemeinsam durchlebt und ich bin unglaublich froh, so tolle, liebevolle Menschen um mich zu haben!