

Aus dem
Berlin Brandenburg Zentrum für Regenerative Therapien
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

**Zelluläre und molekulare Mechanismen der Polyomavirus BK-
spezifischen Immunantwort bei nierentransplantierten Patienten**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Benjamin Johannes Daniel Weist
Aus Berlin

Datum der Promotion: 11.12.2015

Inhaltsverzeichnis:

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
1.1. Zusammenfassung in deutscher Sprache	1
1.2. Zusammenfassung in englischer Sprache (Abstract)	2
1.3. Einleitung	3
1.4. Methodik	5
1.4.1. Publikation 1: <i>The genetic predisposition of natural killer cell to BK virus-associated nephropathy in renal transplant patients</i>	5
1.4.2. Publikation 2: <i>Differential influenza H1N1-specific humoral and cellular response kinetics in kidney transplant patients</i>	5
1.4.3. Publikation 3: <i>The role of CD4⁺ T cells in BKV-specific T cell immunity</i>	6
1.4.4. Publikation 4: <i>A revised strategy for monitoring BKV-specific cellular immunity in kidney transplant patients</i>	6
1.5. Ergebnisse	8
1.5.1. Publikation 1: <i>The genetic predisposition of natural killer cell to BK virus-associated nephropathy in renal transplant patients</i>	8
1.5.2. Publikation 2: <i>Differential influenza H1N1-specific humoral and cellular response kinetics in kidney transplant patients</i>	9
1.5.3. Publikation 3: <i>The role of CD4⁺ T cells in BKV-specific T cell immunity</i>	10
1.5.4. Publikation 4: <i>A revised strategy for monitoring BKV-specific cellular immunity in kidney transplant patients</i>	11
1.6. Diskussion	13
1.7. Literaturverzeichnis	17
2. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	19
3. ANTEILSERKLÄRUNG AN DEN ERFOLGTEN PUBLIKATIONEN	20
4. PUBLIKATIONEN	21
5. DRUCKEXEMPLARE DER AUSGEWÄHLTEN PUBLIKATIONEN	22
6. LEBENSLAUF	81
7. PUBLIKATIONSLISTE	83
5.1 Publikationen	83
5.2. Vorträge	83
5.3. Poster Präsentationen	84
8. DANKSAGUNG	85

1. Zusammenfassung

1.1. Zusammenfassung in deutscher Sprache

Nierentransplantierte Patienten (NTX) benötigen eine dauerhafte, immunsuppressive Therapie um das allogene Transplantat vor einer Abstoßungsreaktion durch das eigene Immunsystem zu bewahren. Aus diesem Grund sind solche Patienten anfällig gegenüber akuten Infektionen (z.B. Influenza) oder der Reaktivierung von latenten Infektionen (z.B. Herpes Viren und Polyomaviren). Im Falle von nierentransplantierten Patienten ist in den letzten zwei Jahrzehnten eine latente Virusinfektion durch das Polyomavirus BK (BKV) zum Hauptrisikofaktor für Transplantatabstoßung geworden [1]. Wenngleich symptomlos im immunkompetenten Individuum [2], kann eine BKV-Reaktivierung im immunsupprimierten NTX-Patienten zu einer BKV-assoziierten Nephropathie (BKVAN) und letztendlich sogar zum Organverlust führen. Bis heute ist keine antivirale Therapie spezifisch gegen BKV etabliert und der Infektion kann nur mit intensivem Monitoring und schrittweiser Anpassung der Immunsuppression begegnet werden. Das Wissen über die zelluläre Immunität gegen BKV ist hierbei noch unvollständig, aber essentiell für eine frühzeitige Diagnose, Prognose sowie die richtige Anpassung der Immunsuppression.

Der Fokus der vorliegenden Arbeit lag daher auf dem besseren Verständnis der Rolle des angeborenen und des adaptiven Immunsystems in der Kontrolle der BKV-Infektion. Hierbei zeigte sich: 1) Eine genetische Prädisposition für eine ineffektive antivirale Antwort durch natürliche Killerzellen (NK-Zellen) in NTX-Patienten, festgestellt mittels Genotypisierung des „Killer Zell Immunoglobulin-ähnlichen Rezeptor“ (KIR) Repertoires. 2) Eine quantitative Dominanz von BKV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen gegenüber CD8⁺ T-Zellen in der BKV-Kontrolle. 3) Der erste Nachweis, dass CD4⁺ T-Zellen auch als zytotoxische Effektoren einen signifikanten Beitrag in der Eindämmung der BKV-Infektion in NTX-Patienten spielen. 4) Die Auswirkung von verschiedenen Immunsuppressiva, die im unterschiedlichen Ausmaß die BKV-spezifische T-Zell Immunität beeinflussen.

Resultierend aus diesen Erkenntnissen wurde ein Protokoll zur verbesserten und sensitiveren Detektion BKV-spezifischer T-Zellen in NTX-Patienten etabliert. Zudem wurde hier der Gedanke einer spezifischen antiviralen Therapie durch einen adaptiven T-Zelltransfer verfolgt. Dies führte zu einem Protokoll zur *in vitro* Expansion autologer BKV-spezifischer T-Zellen, welches selbst auf immunsupprimierte NTX-Patienten und unter GMP-Bedingungen (Good Manufacturing Practice) anwendbar ist.

Darüber hinaus, wurde in einer weiteren Studie die Effektivität und Sicherheit der Vakzinierung immunsupprimierte NTX-Patienten gezeigt.

1.2. Zusammenfassung in englischer Sprache (Abstract)

Kidney allograft recipients require constant immune suppression to avoid allo-immunity and graft rejection. This maintenance immunosuppression leads to an increased risk for acute (e.g. Influenza) and latent viral infections such as herpes viruses and polyomaviruses. In the last two decades the persistent Polyomavirus BK (BKV) emerged as the main risk factor for graft injury and rejection in the field of kidney transplantation. Being harmless for immune competent individuals, the BKV-reactivation in immunosuppressed kidney transplanted patients can lead to a BKV-associated nephropathy (BKVAN) and subsequent graft loss.

To date, no approved antiviral therapy specific for BKV is available. The current treatment strategy is based on constant immune and viral monitoring and adjustment of the immunosuppressive regimen upon BKV-reactivation. Therefore, the knowledge about the cellular immunity against this infection is essential for an early diagnosis and an individualized fine-tuning of the immunosuppression.

The aim of this thesis work was to find a better understanding of the role of the innate and adaptive immunity in controlling BKV-infection. We found: 1) A genetic predisposition of the natural killer (NK) cell antiviral response against BKV, detected by killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) haplotyping. 2) A confirmation of the predominance of CD4⁺ T-cell over CD8⁺ T-cells in controlling BKV. 3) A cytolytic function of CD4⁺ T-cells in containing BKV in KTX-patients, described and proven for the first time. 4) The influence of various immunosuppressive differentially affecting the BKV-specific cellular immunity.

As a result of these findings, an improved protocol for the comprehensive monitoring of BKV-specific T-cells in KTX-patients was implemented. Additionally, an adoptive T-cell transfer was considered as a possible antiviral treatment strategy. Therefore, a GMP (good manufacturing practice) feasible protocol for the *in vitro* expansion of autologous BKV-specific T-cell-lines, generally applicable on immunosuppressed KTX-patients, was developed.

In addition, we showed the efficacy and safety of vaccination in immunosuppressed KTX-patients in a further study.

1.3. Einleitung

Die Nierentransplantation (NTX) ist die Therapie der Wahl bei terminalem Nierenversagen. Im Falle einer Transplantation ist es unerlässlich das Immunsystem des Organempfängers dauerhaft zu supprimieren um eine Abstoßungsreaktion zu verhindern. Dies hat zur Folge, dass auch die Immunantwort gegen Pathogene wie Bakterien, Pilze und Viren eingeschränkt ist und diese eine konstante Bedrohung für den NTX-Patienten darstellen. Speziell das Polyomavirus BK (BKV) hat sich hierbei als besonderes Risiko bei Nierentransplantationspatienten herausgestellt.

BKV ist ein doppelsträngiges DNS Virus, dessen Seroprävalenz weltweit bei über 80% liegt [2]. Wirtszellen sind vor allem tubulo-epitheliale Zellen der Nieren und die Infektion erfolgt vermutlich in den ersten Lebensjahren, worauf das Virus lebenslänglich aber symptomlos in der Niere persistiert [2]. In immunsupprimierten NTX-Patienten kann es allerdings zu einer unkontrollierten Ausbreitung von BKV und damit zur Schädigung des Transplantats bis hin zu einer BKV-assoziierten Nephropathie (BKVAN) kommen. BKVAN betrifft bis zu 10% der NTX-Patienten und führt dabei in 50% der Fälle zu Organversagen [3].

Bis heute fehlt ein erprobtes BKV-spezifisches Virostatikum als Behandlungsoption bei BKV-Reaktivierungen [4, 5]. Eine vielversprechende therapeutische Alternative stellt der adaptive T-Zelltransfer dar [6, 7]. Diese Strategie wurde erfolgreich gegen das humane Zytomegalovirus (CMV) und das Epstein-Barr-Virus (EBV) eingesetzt, es fehlt bisher aber ein entsprechender Ansatz gegen BKV. Die einzige Maßnahme besteht daher bislang darin mithilfe von regelmäßigem Monitoring der Viruslast, der virusspezifischen Immunantwort und Parametern wie des Serumkreatininspiegels Rückschlüsse auf die antivirale Kontrolle und den Transplantatzustand zu erhalten. Mittels dieser Informationen kann die Gabe von immunsuppressiven Medikamenten dahingehend eingestellt werden, dass die BKV-Infektion unter Kontrolle gebracht, das Transplantat aber noch nicht abgestoßen wird. Trotz erster Fortschritte in der Behandlung von nierentransplantierten Patienten, die unter BKV-Reaktivierung leiden, unterliegt insbesondere das Monitoring der spezifischen T-Zellantwort Limitationen, die das Einstellen der richtigen immunsuppressiven Behandlung erschweren. So ist die Frequenz BKV-spezifischer T-Zellen im peripheren Blut deutlich geringer als bei anderen Virusinfektionen wie beispielsweise EBV. Zudem ist die Rolle der T-Zellimmunität gegen BKV in ihren Details noch immer nicht verstanden. Auch der Einfluss immunsuppressiver Medikamente auf

das BKV-spezifische zelluläre Immunsystem, sowohl das Angeborene als auch das Adaptive, ist noch nicht in allen Einzelheiten bekannt.

Hinsichtlich des angeborenen Immunsystems ist bekannt, dass die Abwehr viraler Infektionen wie z.B. CMV [8] oder EBV [9] durch natürliche Killerzellen (NK-Zellen) gewährleistet werden kann und die Wirksamkeit dieser Immunabwehr einer genetischen Prädisposition unterliegt. Im Falle der Immunabwehr gegen BKV ist die Rolle von NK-Zellen derzeit aber noch unklar.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst überprüft wie effektiv eine virusspezifische, zelluläre und humorale Immunantwort bei immunsupprimierten NTX-Patienten erfolgen kann. Zudem wurde die Frage untersucht, ob im Falle einer BKV-Infektion eine nennenswerte Immunität durch natürliche Killerzellen (NK-Zellen) gewährleistet werden kann und wie diese beeinflusst wird. Im Hinblick auf eine mögliche, spezifische Behandlungsoption gegen BKV wurde des Weiteren ein Protokoll zur Generierung autologer BKV-spezifischer T-Zelllinien für einen adaptiven T-Zelltransfer etabliert, welches auch auf immunsupprimierte NTX-Patienten anwendbar ist. Zuletzt wurde der Einfluss verschiedener immunsupprimierender Medikamente auf die BKV-spezifische T-Zellimmunität untersucht und ein Protokoll zur verbesserten *ex vivo* Erfassung BKV-spezifischer T-Zellen in immunsupprimierten NTX-Patienten erarbeitet.

1.4. Methodik

Eine ausführliche Darstellung der angewandten Methoden findet sich in den beiliegenden Publikationen 1-4. Im Folgenden sind diese Methoden zusammengefasst.

1.4.1. Publikation 1: *The genetic predisposition of natural killer cell to BK virus-associated nephropathy in renal transplant patients*

Die BKV-Viruslast in peripherem Blut von 48 NTX-Patienten mit Biopsie-gesicherten BKVAN und 110 NTX-Patienten ohne BKVAN wurde mittels Real Time Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR) bestimmt. Hierbei wurden nur Patienten für die Kontrollgruppe berücksichtigt, die auch in einem Follow-up von sechs Jahren keinerlei Anzeichen einer BKV-Reaktivierung aufwiesen. Sowohl Spender als auch Transplantatempfänger wurden zuvor auf ihren HLA-Typ hin genotypisiert.

Die Killerzellen Immunglobulin Rezeptoren (KIR) wurden ebenfalls mittels modifizierter PCR genotypisiert und dabei die Exons 3, 4, 7, 8 und 9 des KIR-Genlokus auf dem Chromosom 19q13.4 amplifiziert. Besondere Beachtung fanden hier 6 aktivierende sowie 8 inhibierende KIRs, die aufgrund ihrer Lage zum aktivierenden KIR2DS4 in telomerisch oder zentromerisch eingeteilt wurden.

1.4.2. Publikation 2: *Differential influenza H1N1-specific humoral and cellular response kinetics in kidney transplant patients*

16 NTX-Patienten und 17 gesunde Probanden mit vergleichbarer Alters- und Geschlechtsverteilung wurden mit Pandemrix vakziniert. Dabei handelt es sich um einen adjuvanzhaltigen Impfstoff gegen pandemische Influenza vom Typ H1N1. Eine vorangegangene Impfung mit einem saisonalen H1N1-Impfstoff galt als Ausschlusskriterium. Alle Untersuchungen wurden zum Zeitpunkt 0, am Tag 21 post Vakzinierung (p.V.), Tag 28 p.V. sowie bei NTX-Patienten auch am Tag 90 p.V. durchgeführt. Hierbei wurde die T-Zellimmunität gegen H1N1 (sowie Kreuzspezifitäten) mittels Durchflusszytometrie und die Antikörpertiter gegen H1N1 mittels

Hämagglutinations-Assay bestimmt. In das Protokoll zur Erfassung der T-Zellimmunität flossen die Erkenntnisse bezüglich der Kinetiken von Aktivierungsmarkern aus Publikation 3 mit ein, sodass die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) für insgesamt 16 Stunden stimuliert wurden. Zudem wurden alloreaktive T-Zellantworten mittels Interferon γ (IFN γ)-Elispot erfasst und die alloreaktiven Prozesse im Transplantat mithilfe des Inflammationsassoziierten Proteins 10 (IP10) sowie der Kreatininkonzentration im Serum gemessen.

1.4.3. Publikation 3: *The role of CD4⁺ T cells in BKV-specific T cell immunity*

PBMC von 32 gesunden Probanden sowie 2 NTX-Patienten wurden untersucht. *Ex vivo* T-Zellantworten wurden durch Stimulation der PBMC mit einem überlappenden Peptidpool (15mere) generiert, der alle fünf immundominanten BKV-Gene (VP1, VP2, VP3, small T, large T) umfasst (BKVPPM). Die Anreicherung der BKV-spezifischen T-Zellen erfolgte nach Peptidstimulation über INF γ -, Tumornekrosefaktor α - (TNF α) oder CD154-Sekretions Assays unter Anwendung der auf magnetischen Antikörpern basierten Sortierung von Zellen (MACS). Für die CD137-basierte Anreicherung wurde eine durchflusszytometrische Sortierung angewandt (FACS). Die T-Zelllinien wurden nach *in vitro* Expansion mit Interleukin 2 (IL2) und Interleukin 7 (IL7) mit BKV-peptidbeladenen autologen lymphoblastischen B-Zelllinien (LCL) restimuliert und mittels Zytotoxizitätsassay auf ihre lytische Funktion hin überprüft. Bei allen Untersuchungen der T-Zellen in dieser Arbeit kam die Multiparameterdurchflusszytometrie zur Anwendung.

1.4.4. Publikation 4: *A revised strategy for monitoring BKV-specific cellular immunity in kidney transplant patients*

BKV-spezifische T-Zelllinien gesunder Probanden wurden mittels IFN γ -Sekretionsassay angereichert und expandiert. Die Expansion erfolgte unter Einfluss von Rapamycin (RAPA), Cyclosporin A (CsA), Tacrolimus (TAC), Mycophenolat Mofetil (MMF) und Prednisolon (PRED). Zudem wurden PBMC von NTX-Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten der BKV-Reaktivierung, beziehungsweise nach Abklingen der BKV-Reaktivierung, untersucht. Dabei wurden PBMC *ex vivo* mit BKVPPM stimuliert und die T-

Zellantworten gegen BKV analysiert. Bei allen Untersuchungen kam die Multiparameterdurchflusszytometrie zur Anwendung. Viruslasten im Plasma wurden mittels RT-PCR bestimmt.

1.5. Ergebnisse

Eine ausführliche Darstellung der Ergebnisse findet sich in den beiliegenden Publikationen 1-4. Im Folgenden sind diese zusammengefasst.

1.5.1. Publikation 1: *The genetic predisposition of natural killer cell to BK virus-associated nephropathy in renal transplant patients*

Die NK-Zellen des angeborenen Immunsystems spielen eine wichtige Rolle in der Abwehr von Virusinfektionen [8, 9]. Im Falle von NTX- und stammzelltransplantierten Patienten konnte ein Zusammenhang zwischen dem KIR-Genotyp und dem Auftreten einer CMV-Reaktivierung nach Transplantation gezeigt werden [8]. Bisher fehlten aber vergleichbare Untersuchungen in Bezug auf eine BKV-Reaktivierung bei NTX-Patienten.

Basierend auf früheren Publikationen wurde des Weiteren der KIR-Haplotyp in Typ A und B eingeteilt und mit dem Auftreten einer BKVAN in Bezug gesetzt. Dabei konnte der Haplotyp A, der durch einen aktivierenden KIR (2DS4) und drei inhibierenden KIRs (2DL1, 2DL3, 1DL3) gekennzeichnet ist, weder mit einem Ausbleiben oder Auftreten einer BKVAN in NTX-Patienten assoziiert werden. Gleiches konnte für den sehr viel variablen Haplotyp B, bei dem mehr als ein aktivierender und mehrere inhibierende KIRs auftreten, beobachtet werden. Allerdings zeigte sich hier ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Entwicklung einer BKVAN und dem telomerischen, nicht aber dem centromerischen, Haplotyp.

Da die NK-Zellaktivität über die Summe und das Zusammenwirken von aktivierenden bzw. inhibierenden KIR reguliert wird, wurde weiterhin untersucht, ob die Summe der jeweiligen KIRs einen Einfluss auf die Entwicklung einer BKVAN hat. Dies konnte für inhibierende KIRs nicht bestätigt werden, wohingegen eine verringerte Anzahl aktivierender KIRs eindeutig mit dem Auftreten einer BKVAN assoziiert werden konnte. Ebenfalls wurde ein signifikant verringertes Auftreten des aktivierenden KIR3DS1 in der BKVAN-Patientengruppe nachgewiesen. Zuletzt wurde zudem festgestellt, dass kein Zusammenhang zwischen den KIRs und ihren passenden Bindungspartnern zur Antigenpräsentation, den humanen Leukozyten Antigenen (HLA), besteht.

Zusammenfassend zeigten die erhaltenen Daten, dass Immunsuppression, das männliche Geschlecht des Transplantatempfängers, das Transplantatalter, das telomerische KIR-Motif, ein fehlender aktivierender KIR3DS1 sowie eine verringerte Anzahl aktivierender KIR-Motive voneinander unabhängige Risikofaktoren für die Entwicklung einer BKVAN nach Nierentransplantation darstellen. Zudem konnte der schützende Einfluss der NK-Zellimmunität vor einer BKV-Reaktivierung belegt werden.

1.5.2. Publikation 2: *Differential influenza H1N1-specific humoral and cellular response kinetics in kidney transplant patients*

Aufgrund der immunsuppressiven Behandlung von NTX-Patienten sind diese besonders anfällig für virale Infektionen, sowohl latente als auch saisonale, akute Infektionen. Während erprobte Schutzimpfungen bei gesunden Menschen in der Regel komplikationslos und effektiv verlaufen, ist die Effektivität und Sicherheit von Immunisierungen bei NTX-Patienten, insbesondere bei neuen Impfstoffen, nicht bekannt. Diese Behandlungsoption sollte daher auf Ihre Effektivität und Sicherheit im Kontext einer Nierentransplantation evaluiert werden. Dabei zeigten sich vergleichbare, spezifische T-Zellantworten gegen das pandemische Influenzavakzin 21 Tage p.V. sowohl in gesunden Probanden als auch in NTX-Patienten. Im Gegensatz dazu war die humorale Antwort der NTX-Patienten 21 Tage p.V. signifikant niedriger als die der gesunden Probanden. Erst nach einer erneuten Vakzinierung erreichten auch die NTX-Patienten vergleichbar hohe Antikörpertiter gegen pandemische Influenza H1N1 90 Tage p.V.

Interessanterweise ließ sich nach einer Vakzinierung mit einem pandemischen Influenzaimpfstoff auch ein Anstieg der saisonalen influenzaspezifischen T-Zellen beobachten, was auf eine Kreuzaktivierung durch den pandemischen H1N1-Stamm hinweist. Dabei stellte sich aber zugleich heraus, dass keinerlei unspezifische („bystander“) zelluläre Immunität nach 21 p.V. ausgelöst wurde und auch hinsichtlich einer theoretisch verstärkten allospezifischen T-Zellantwort zeigten sich keine vakzinierungsbedingten, negativen Effekte.

Letztlich war in den NTX-Patienten auch eine verringerte Frequenz spezifischer IFN γ produzierender T-Zellen im Vergleich zu CD154 exprimierenden T-Zellen festzustellen. Die Frequenz der IFN γ -produzierenden T-Zellen in NTX-Patienten war dabei auch im Vergleich zu den gesunden Probanden deutlich erniedrigt

1.5.3. Publikation 3: *The role of CD4⁺ T cells in BKV-specific T cell immunity*

Der adaptive virusspezifische T-Zelltransfer ist eine neue Behandlungsoption, die sich als wirksam gegen latente virale Infektionen, wie beispielsweise EBV und CMV, bei immunsupprimierten Transplantationspatienten gezeigt hat [7]. Trotz ersten Bemühungen diesen Ansatz auch für einen BKV-spezifischen T-Zelltransfer anzuwenden, fehlte bislang ein Protokoll zur spezifischen Anreicherung dieser T-Zellen unter GMP-Bedingungen, welches auch auf immunsupprimierte NTX-Patienten übertragbar ist.

Daher wurden zunächst die optimalen Bedingungen evaluiert um BKV-spezifische T-Zellen *ex vivo* in PBMC zu stimulieren. Dabei erwies sich eine BKVPPM Konzentration von 5µg/mL als wirksam um sowohl BKV-spezifische CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen zu aktivieren. Zudem zeigten sich sowohl IFN γ , TNF α , CD154 als auch CD137 als mögliche Aktivierungsmarker um diese Zellen zu markieren und anzureichern. Hierbei empfahlen sich nach vorhergegangenem zweitägigen „Ruhe“ der PBMC *in vitro* für IFN γ und TNF α kurze Stimulationszeiten um ein optimales Verhältnis von spezifisch und unspezifisch aktivierten T-Zellen zu erreichen. Für die aktivierungsinduzierten Oberflächenmoleküle CD137 und CD154 zeigte sich hingegen, dass die PBMC *ex vivo* und 16 Stunden lang stimuliert werden sollten.

Wir stellten fest, dass alle vier Effektormoleküle (IFN γ , TNF α , CD137, CD154) grundsätzlich für die spezifische Zellanreicherung und die nachfolgende *in vitro* Expansion von BKV-spezifischen T-Zelllinien nutzbar sind. Der direkte Vergleich der T-Zelllinien empfahl schließlich ein weiteres Vorgehen über ein IFN γ -Sekretionsassay. Die so angereicherten BKV-spezifischen T-Zellen wiesen den größten Anteil an sogenannten multifunktionalen T-Zellen auf, denen eine erhöhte antivirale Protektivität zugeschrieben wird. Zusätzlich ist diese Methode unter GMP-Bedingungen anwendbar und ließ sich in nachfolgenden Versuchen auch auf zwei immunsupprimierte NTX-Patienten übertragen. Das so gewonnene autologe T-Zellprodukt erwies sich als hoch spezifisch (>65% BKV-spezifische T-Zellen im Endprodukt) und quantitativ für einen T-Zelltransfer geeignet.

Zytotoxizitätstests mit den generierten T-Zelllinien zeigten interessanterweise die Fähigkeit von CD4⁺ T-Zellen BKVPPM-beladene LCL zu lysieren. Das korrelierende Effektormolekül war hierbei zytotoxisches GranzymB.

Die im Rahmen dieser Untersuchung gewonnen Erkenntnisse, wie der Beweis, dass alle vier untersuchten aktivierungsinduzierten Effektormoleküle (IFN γ , TNF α , CD137 und

CD154) zur Identifikation BKV-spezifischer T-Zellen herangezogen werden können, wurden in der nachstehenden Publikation 4 berücksichtigt. Ebenso flossen das Wissen über GranzymB als wichtiges Effektormolekül zur BKV-spezifischen Zelllyse und die Erkenntnisse zur Stimulationsdauer sowie benötigter BKVPPM-Konzentrationen in das in Publikation 4 vorgestellte Protokoll zur *ex vivo* Identifizierung und Charakterisierung BKV-spezifischer T-Zellen mit ein.

1.5.4. Publikation 4: *A revised strategy for monitoring BKV-specific cellular immunity in kidney transplant patients*

Ein grundsätzliches Problem bei der *ex vivo* Charakterisierung und Detektion BKV-spezifischer T-Zellen ist deren niedrige Frequenz im peripheren Blut. Dies erschwert das Monitoring der BKV-spezifischen Immunantwort in immunsupprimierten NTX-Patienten. Wir konnten zeigen, dass über membrangebundene Aktivierungsmarker wie CD154 und CD137 höhere Frequenzen von Virus-spezifischen T-Zellen nachweisbar sind als über das Effektormolekül $IFN\gamma$ (siehe Publikation 2). Des Weiteren ist der Effekt von immunsuppressiven Medikamenten auf die BKV-spezifische Immunität und damit auf das Immunmonitoring von NTX-Patienten noch nicht in allen Details verstanden. Das Immunmonitoring selbst beruht bis dato oft auf der spezifischen Expression von $IFN\gamma$ durch T-Zellen.

Der Einfluss der Calcineurininhibitoren TAC und CsA, des immunsuppressiven Glucocorticoids PRED und der Proliferationshemmer RAPA und MMF auf BKV-spezifische T-Zellen wurde untersucht. Hierbei zeigte die Behandlung mit PRED, TAC und CsA eine signifikante Verringerung (>80%) der durch BKV-Peptide induzierten Expression der Zytokine $TNF\alpha$, $IFN\gamma$, IL2 im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen. Diese Verringerung konnte in einem geringeren Maße (<60%) auch für die Moleküle CD137, CD154 und GranzymB beobachtet werden. Im Gegensatz zu TAC, CsA und PRED war dieser negative Effekt auf die spezifische T-Zellaktivierung nicht nach Gabe der Proliferationshemmer RAPA und MMF zu beobachten. Die zytotoxische Effektorfunktion der behandelten T-Zelllinien war unter Einfluss aller fünf Immunsuppressiva zu beobachten, zeigte aber einen signifikanten Abfall unter der Gabe der Calcineurininhibitoren. Interessanterweise zeigte sich keine Beeinträchtigung der zytotoxischen Kapazität der BKV-spezifischen T-Zellen durch MMF und RAPA.

Aufgrund dieser Ergebnisse erfolgte eine Bestimmung von BKV-spezifischen T-Zell-Subpopulationen unter Ausschluss von Zytokinen mittels Durchflusszytometrie. Dabei wurden T-Helferzellen als $CD4^+CD137^+CD154^+$ definiert (zuvor $CD4^+CD154^+IFN\gamma^+$), zytotoxische T-Zellen als $CD4^+CD137^+GranzymB^+$ bzw. $CD8^+CD137^+GranzymB^+$ (zuvor $CD8^+CD137^+IFN\gamma^+$). Die Frequenz der *ex vivo* gemessenen BKV-spezifischen T-Zellen in immunsupprimierten NTX-Patienten ließ sich so um den Faktor 4,2 (Median, Interquartil-Bereich 1.97 – 8.89) steigern. Zu bemerken war zudem, dass diese neue Definition der T-Zellpopulation die vorangegangene und etablierte Bestimmung der BKV-spezifischen T-Zellen einschließt.

Mit diesem neuen, durchflusszytometrisch basierten Protokoll zum Immunmonitoring wurden die PBMC von NTX-Patienten mit BKV-Reaktivierung zu Zeitpunkten während ansteigender Viruslast, wieder abfallender Viruslast und nach überstandener BKV-Reaktivierung (Clearing) untersucht. Dabei konnte beobachtet werden, dass mit abnehmender Viruslast nicht nur die Frequenz von T-Helferzellen, sondern auch die Frequenz zytotoxischer $CD4^+$ T-Zellen signifikant zunahm. BKV-spezifische zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen konnten zu allen Zeitpunkten beobachtet, nicht aber mit der Bekämpfung der BKV-Reaktivierung korreliert werden.

Der Vergleich mit gesunden Probanden und NTX-Patienten ohne BKV-Reaktivierung wies zudem darauf hin, dass zum Zeitpunkt der BKV-Reaktivierung signifikant verringerte Frequenzen beider $CD4^+$ T-Zelltypen in peripheren Blut nachweisbar sind und dieser Mangel in Verbindung mit der BKV-Reaktivierung steht. Für die Definition eines Schwellenwertes zum Einschätzen des Risikos eine BKV-Reaktivierung zu erleiden war die Datenerhebung allerdings ungeeignet. Für einen Richtwert dieser Art bedarf es einer weiteren prospektiven Studie, für dessen Durchführung sich das hier vorgestellte durchflusszytometrische Protokoll zum *ex vivo* Immunmonitoring anbietet.

1.6. Diskussion

BKV stellt eine große Herausforderung im Bereich der Nierentransplantation dar. Ein detailliertes Wissen über die Rolle der BKV-spezifischen Immunität sowie der Einfluss, der derzeit in der Klinik verwendeten Immunsuppressiva auf diese, sind für die Behandlung der NTX-Patienten eminent.

In dieser Arbeit konnte zunächst die Rolle des angeborenen und des adaptiven Immunsystems näher beleuchtet werden. So zeigte sich, dass die antivirale Kontrolle durch NK-Zellen einen wichtigen Teil der Immunantwort gegen BKV darstellt und diese einer genetischen Prädisposition unterliegt [10]. Der hier beschriebene aktivierende KIR NK3DS1 wurde auch in anderen Studien als antiviral protektiv beschrieben, wie beispielsweise gegen humane Papillomviren [11] oder Herpes-Simplex-Virus-induzierte Tumore [12]. Des Weiteren zeigten Bauman et al., dass BKV und das eng verwandte JC-Virus mithilfe von mikroRNAs die Expression des stressinduzierten ULBP3 in den Wirtszellen negativ regulieren können [13]. Im Falle einer Infektion der Wirtszelle dient ULBP3 als aktivierender Ligand für den NK-Zellrezeptor NKG2D. Sein Fehlen auf BKV-infizierten Zellen kann somit als ein Mechanismus zum Vermeiden einer antiviralen NK-Zellantwort gedeutet werden. Die Wichtigkeit des Rezeptors NKG2D in der Abwehr von Polyomavirus induzierten Tumoren durch NK-Zellen konnte auch im Mausmodell nachgewiesen werden [14].

Die Wichtigkeit von NK-Zellen als Teil des angeborenen Immunsystems in der antiviralen Immunantwort liegt nicht nur in der direkten Lyse infizierter Zellen, sondern auch in der Aktivierung der adaptiven Immunantwort wie der T-Zellen. Letztere spielen in der Kontrolle von BKV-Infektionen nachweislich eine entscheidende Rolle [15], was auch mit unseren Ergebnissen bestätigt werden konnte (Publikation 4). Auch in vorangegangenen Beobachtungen wurde bereits deutlich, dass eine schwache BKV-spezifische Immunantwort durch T-Zellen mit der Reaktivierung von BKV assoziiert werden kann [15]. Wir konnten zudem nachweisen, dass sowohl zytotoxische als auch Helfer T-Zellen in ihrer Frequenz im peripheren Blut von NTX-Patienten im Vergleich zu den Kontrollgruppen signifikant verringert sind (Publikation 4). Interessanterweise konnte hier erstmalig *ex vivo* gezeigt werden, dass zytotoxische CD4⁺ T-Zellen mit einem Abfall der BKV-Last in NTX-Patienten assoziiert werden können. Zudem konnte die zytotoxische Funktionalität von BKV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen *in vitro* nachgewiesen werden (Publikation 3).

Die Rolle der BKV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen bleibt allerdings unklar. So konnten wir eine verringerte Frequenz dieser Zellen in NTX-Patienten mit ansteigender Viruslast und eine Tendenz zum Frequenzanstieg bei Viruslastabfall beobachten. Allerdings konnten diese Veränderungen nicht signifikant bestätigt werden. In einer früheren Studie von Hammer et al. konnten BKV-spezifische CD8⁺ T-Zellen in lediglich zwei von 15 NTX-Patienten nachgewiesen werden. Dass diese zwei Patienten im Gegensatz zu den restlichen 13 nachfolgend ihr Transplantat verloren [17], erschwert die Einschätzung der Rolle BKV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen im klinischen Verlauf der BKV-Reaktivierung.

Der Einfluss der humoralen Immunantwort gegen BKV wird derzeit noch diskutiert. So wurden initial fehlende Antikörper gegen BKV als Risikofaktor für die Entwicklung einer BKVAN [18] und hohe BKV-spezifischer IgG-Antikörpertiter in NTX-Patienten mit steigender Viruslast beschrieben [19]. Allerdings zeigte die Studie von Bohl et al. auch, dass ein hoher IgG-Antikörpertiter allein nicht ausreicht um eine anhaltende BKV-Reaktivierung einzudämmen [20]. Demnach ist zu vermuten, dass die humorale Immunantwort eine unterstützende Funktion gegen BKV hat, aber nicht entscheidend ist. Wir konnten hier zeigen, dass die humorale Immunität auch unter Immunsuppression, hier nach Impfung, grundsätzlich vorhanden bzw. initiiierbar ist, wenn auch zeitlich verzögert (Publikation 2). Diese zeitliche Verzögerung und das Erfordernis einer zweiten Vakzinierung könnten die nicht eindeutigen Befunde früherer Studien zur humoralen Immunität in BKV-reaktivierenden NTX-Patienten erklären [18, 19, 20], wobei sich erstere durch die bei NTX-Patienten zwar quantitativ vorhandene, aber in ihrer Zytokinexpression eingeschränkte T-Zellimmunantwort gegen das Vakzin erklären lässt. T-Zellen haben dabei die Aufgabe antigenspezifische B-Zellen zu einem Antikörperklassenwechsel und zur Differenzierung zu Plasmazellen zu stimulieren.

Anhand dieser Erkenntnisse kann geschlossen werden, dass eine eingeschränkte oder nicht vorhandene angeborene [10] oder adaptive (sowohl zelluläre als auch humorale) Immunität gegen BKV ein Risikofaktor für die Entwicklung einer BKVAN darstellt. Demnach scheint ein Zusammenspiel des angeborenen und dem adaptiven Immunsystem nötig für eine umfassende und effektive Immunantwort gegen BKV zu sein. Interessanterweise können BKV-spezifische T-Zellen direkt mit einem positiven Verlauf einer BKV-Reaktivierung korreliert werden und scheinen somit den entscheidenden Faktor in diesem Zusammenspiel darzustellen [[21], Publikation 4]. Insbesondere sind hier die CD4⁺ T-Zellen zu nennen, die gegen BKV nicht nur als Helfer sondern auch direkt als lytische Effektoren agieren können [[22], Publikation 4].

Dass insbesondere die T-Zellimmunität eine entscheidende Rolle in der Transplantatabstoßung spielt und der Einsatz von Immunsuppressiva unverzichtbar ist, ist

lange bekannt. Der genaue Einfluss der Immunsuppression auf die BKV-spezifische Immunität wurde allerdings zuvor nicht in allen Details untersucht [23]. In dieser Arbeit konnten die Ergebnisse von Egli et al. bestätigt und ergänzt werden [23]. So zeigte sich erstmalig, dass eine BKV-spezifische lytische Effektorfunktion der T-Zellen auch unter dem Einfluss von Calcineurininhibitoren oder PRED noch vorhanden ist, wenn auch eingeschränkt (Publikation 4). Zudem konnte gezeigt werden, dass sogenannte multifunktionale CD4⁺ T-Zellen unter dem Einfluss von diesen Immunsuppressiva im peripheren Blut kaum zu finden sind (Publikation 4). Diese multifunktionalen T-Zellen wurden zuvor aber mit einem positiven Krankheitsverlauf assoziiert [21]. Antiproliferative Immunsuppressiva wie MMF und RAPA erlauben hingegen eine uneingeschränkte Zytolyse, was eine weitere Erklärung für einen positiven Verlauf einer BKV-Reaktivierung in NTX-Patienten bei Verabreichung dieser Medikamente unter verminderter Gabe von Calcineurininhibitoren bietet. Allerdings ist dafür das Vorhandensein BKV-spezifischer T-Zellen, allen voran multifunktionale und zytolytische CD4⁺ T-zellen, eine Grundvoraussetzung (Publikation 4).

Für eine individualisierte, immunsuppressive Behandlung von NTX-Patienten mit vorhandener oder dem Risiko einer BKV-Reaktivierung ist es eminent wichtig die BKV-spezifische T-Zellimmunität sowohl quantitativ als auch qualitativ zu erfassen. Das in dieser Arbeit vorgestellte Protokoll zum Immunmonitoring erlaubt diese Unterscheidung von Quantität und Qualität sowohl der BKV-spezifischen CD4⁺ als auch der CD8⁺ T-Zellen (Publikation 4). Unsere Ergebnisse zeigen deutlich, dass eine quantitativ uneingeschränkte T-Zellimmunität bestehen kann, deren funktionale Einschränkung (z.B. in der Zytokinexpression) aber zu einer verminderten Aktivierung von B-Zellen und damit einer verringerten humoralen Immunität führen kann (Publikation 2). Hier liegt der Vorteil unseres Protokolls im Vergleich zu der derzeit primär durchgeführten *ex vivo* Detektion BKV-spezifischer Immunität über die Messung von IFN γ -Sekretion [15, 17, 24]. Ein weiterer Vorteil liegt in der erhöhten Sensitivität, da die zelluläre BKV-spezifische Immunität im peripheren Blut häufig niedrige Frequenzen aufweist. Es ist daher zu vermuten, dass mit weniger sensitiven Methoden falsch negative Befunde entstehen könnten.

Zuletzt ist das in Publikation 3 vorgestellte Protokoll für die Generierung BKV-spezifischer T-Zelllinien für einen adaptiven T-Zelltransfer zu erwähnen. In vorherigen Studien zeigte sich die Wirksamkeit und Sicherheit eines solchen Therapieansatzes im Falle anderer viraler Infektionen in immunsupprimierten Transplantatempfängern [6, 7, 25]. Der hier vorgestellte Ansatz greift vorhergegangene Studien auf in denen zwar BKV-spezifische T-Zelllinien generiert wurden, diese aber in ihrer Reinheit und Spezifität ungenügend waren

[25, 26]. Zudem wurde dabei kein Ansatz vorgestellt, der zeitnah unter GMP-Bedingungen umzusetzen ist. Hier liegt der Vorteil in dem vorgestellten Protokoll, da es hohe Spezifitäten im T-Zellprodukt erlaubt, unter GMP-Bedingungen anzuwenden und auch in ausreichender Quantität [7, 27] auf NTX-Patienten übertragbar ist.

Die T-Zellanreicherung über $\text{IFN}\gamma$ stellt keinen Widerspruch zu der beschriebenen eingeschränkten $\text{IFN}\gamma$ -Expression der T-Zellen unter Immunsuppression dar. Laut unserem Protokoll geht der $\text{IFN}\gamma$ -basierten BKV-spezifischen T-Zellanreicherung eine zweitägige in vitro Kultivierung der KTX-Patienten-PBMC voraus. Somit befinden sich die PBMC für zwei Tage in einem immunsuppressionsfreien Milieu in dem sich die Zellen von dem Einfluss der immunsuppressiven Medikamente „erholen“ können.

Schlussendlich führen die hier vorgestellten Publikationen zu einem besseren Verständnis der BKV-spezifischen Immunantwort im Allgemeinen, sowie unter Immunsuppression im Besonderen. Das etablierte, sensitivere Protokoll zum Immunmonitoring eröffnet neue Perspektiven für die individualisierte Behandlung, ob präventiv oder akut, von NTX-Patienten. Zudem stellt der BKV-spezifische, adaptive T-Zelltransfer eine zukünftige Behandlungsmöglichkeit dar, welche die Reduktion der Immunsuppression umgehen und damit potentiell das Risiko einer Transplantatabstoßung verringern kann.

1.7. Literaturverzeichnis

1. Ramos, E., et al., *The decade of polyomavirus BK-associated nephropathy: state of affairs*. Transplantation, 2009. **87**(5): p. 621-30.
2. Goudsmit, J., et al., *The role of BK virus in acute respiratory tract disease and the presence of BKV DNA in tonsils*. J Med Virol, 1982. **10**(2): p. 91-9.
3. Randhawa, P.S., et al., *Human polyoma virus-associated interstitial nephritis in the allograft kidney*. Transplantation, 1999. **67**(1): p. 103-9.
4. Kwon, H.J., et al., *Treatment of BK virus-associated hemorrhagic cystitis in pediatric hematopoietic stem cell transplant recipients with cidofovir: a single-center experience*. Transpl Infect Dis, 2013. **15**(6): p. 569-74.
5. Rinaldo, C.H., et al., *1-O-hexadecyloxypropyl cidofovir (CMX001) effectively inhibits polyomavirus BK replication in primary human renal tubular epithelial cells*. Antimicrob Agents Chemother, 2010. **54**(11): p. 4714-22.
6. Balduzzi, A., et al., *Polyomavirus JC-targeted T-cell therapy for progressive multiple leukoencephalopathy in a hematopoietic cell transplantation recipient*. Bone Marrow Transplant, 2011. **46**(7): p. 987-92.
7. Brestrich, G., et al., *Adoptive T-cell therapy of a lung transplanted patient with severe CMV disease and resistance to antiviral therapy*. Am J Transplant, 2009. **9**(7): p. 1679-84.
8. Cook, M., et al., *Donor KIR genotype has a major influence on the rate of cytomegalovirus reactivation following T-cell replete stem cell transplantation*. Blood, 2006. **107**(3): p. 1230-2.
9. Lu, Z., et al., *Association of KIR genotypes and haplotypes with susceptibility to chronic hepatitis B virus infection in Chinese Han population*. Cell Mol Immunol, 2008. **5**(6): p. 457-63.
10. Trydzenskaya, H., et al., *The genetic predisposition of natural killer cell to BK virus-associated nephropathy in renal transplant patients*. Kidney Int, 2013. **84**(2): p. 359-65.
11. Bonagura, V.R., et al., *Activating killer cell immunoglobulin-like receptors 3DS1 and 2DS1 protect against developing the severe form of recurrent respiratory papillomatosis*. Hum Immunol, 2010. **71**(2): p. 212-9.
12. Lopez-Vazquez, A., et al., *Protective effect of the HLA-Bw4I80 epitope and the killer cell immunoglobulin-like receptor 3DS1 gene against the development of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection*. J Infect Dis, 2005. **192**(1): p. 162-5.
13. Bauman, Y., et al., *An identical miRNA of the human JC and BK polyoma viruses targets the stress-induced ligand ULBP3 to escape immune elimination*. Cell Host Microbe, 2011. **9**(2): p. 93-102.
14. Mishra, R., et al., *NK cells and gammadelta T cells mediate resistance to polyomavirus-induced tumors*. PLoS Pathog, 2010. **6**(5): p. e1000924.
15. Binggeli, S., et al., *Polyomavirus BK-specific cellular immune response to VP1 and large T-antigen in kidney transplant recipients*. Am J Transplant, 2007. **7**(5): p. 1131-9.
16. Zhou, W., et al., *Functional characterization of BK virus-specific CD4⁺ T cells with cytotoxic potential in seropositive adults*. Viral Immunol, 2007. **20**(3): p. 379-88.
17. Hammer, M.H., et al., *HLA type-independent method to monitor polyoma BK virus-specific CD4 and CD8 T-cell immunity*. Am J Transplant, 2006. **6**(3): p. 625-31.
18. Ginevri, F., et al., *Polyomavirus BK infection in pediatric kidney-allograft recipients: a single-center analysis of incidence, risk factors, and novel therapeutic approaches*. Transplantation, 2003. **75**(8): p. 1266-70.
19. Randhawa, P., et al., *Longitudinal analysis of levels of immunoglobulins against BK virus capsid proteins in kidney transplant recipients*. Clin Vaccine Immunol, 2008. **15**(10): p. 1564-71.

20. Bohl, D.L., et al., *BK virus antibody titers and intensity of infections after renal transplantation*. J Clin Virol, 2008. **43**(2): p. 184-9.
21. Trydzenskaya, H., et al., *Novel approach for improved assessment of phenotypic and functional characteristics of BKV-specific T-cell immunity*. Transplantation, 2011. **92**(11): p. 1269-77.
22. Weist, B.J., et al., *The role of CD4 T cells in BKV-specific T cell immunity*. Med Microbiol Immunol, 2014. **203**(6): 395-408.
23. Egli, A., et al., *Inhibition of polyomavirus BK-specific T-Cell responses by immunosuppressive drugs*. Transplantation, 2009. **88**(10): p. 1161-8.
24. Mueller, K., et al., *BK-VP3 as a new target of cellular immunity in BK virus infection*. Transplantation, 2011. **91**(1): p. 100-7.
25. Comoli, P., et al., *Dendritic cells pulsed with polyomavirus BK antigen induce ex vivo polyoma BK virus-specific cytotoxic T-cell lines in seropositive healthy individuals and renal transplant recipients*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(12): p. 3197-204.
26. Geyeregger, R., et al., *Short-term in-vitro expansion improves monitoring and allows affordable generation of virus-specific T-cells against several viruses for a broad clinical application*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e59592.
27. Gerdemann, U., et al., *Safety and clinical efficacy of rapidly-generated trivirus-directed T cells as treatment for adenovirus, EBV, and CMV infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplant*. Mol Ther, 2013. **21**(11): p. 2113-21.

2. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Benjamin Weist, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *„Zelluläre und molekulare Mechanismen der Polyomavirus BK-spezifischen Immunantwort bei nierentransplantierten Patienten“*

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Benjamin Weist

Berlin, den

3. Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Benjamin Weist hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Trydzenskaya H, Juerchott K, Lachmann N, Kotsch K, Kunert K, **Weist B**, Schönemann C, Schindler R, Nickel P, Melzig MF, Hugo C, Thomusch O, Neumann AU, Reinke P, Babel N.

The genetic predisposition of natural killer cell to BK virus-associated nephropathy in renal transplant patients. Kidney Int. 2013 Aug;84(2):359-65

Beitrag: 5%

Beitrag im Einzelnen: Assistenz bei der Erhebung der Daten und dem Verfassen des Manuskripts

Publikation 2: Rambal V, Müller K, Dang-Heine C, Sattler A, Dziubianau M, **Weist B**, Luu SH, Stoyanova A, Nickel P, Thiel A, Neumann A, Schweiger B, Reinke P, Babel N. *Differential influenza H1N1-specific humoral and cellular response kinetics in kidney transplant patients.* Med Microbiol Immunol. 2014 Feb;203(1):35-45

Beitrag: 10%

Beitrag im Einzelnen: Assistenz bei der Erhebung der Daten, der Datenanalyse und dem Verfassen des Manuskripts

Publikation 3: **Weist BJ**, Schmueck M, Fuehrer H, Sattler A, Reinke P, Babel N. *The role of CD4⁺ T cells in BKV-specific T cell immunity.* Med Microbiol Immunol. 2014 Jul 23.

Beitrag: 80%

Beitrag im Einzelnen: Experimentelles Design. Durchführung aller Experimente und der Datenanalyse. Verfassen des Manuskripts.

Publikation 4: **Weist BJ**, Wehler P, El Ahmad L, Schmueck M, Reinke P, Babel N. *A revised strategy for monitoring BKV-specific cellular immunity in kidney transplant patients.* Accepted at Kidney Int. 21/05/2015

Beitrag: 85%

Beitrag im Einzelnen: Experimentelles Design. Durchführung der meisten Experimente und die Durchführung der Datenanalyse. Verfassen des Manuskripts.

Prof. Dr. med. Nina Babel

Berlin, den

Benjamin Weist

Berlin, den

4. Publikationen

Publikation 1:

Trydzenskaya H, Juerchott K, Lachmann N, Kotsch K, Kunert K, **Weist B**, Schönemann C, Schindler R, Nickel P, Melzig MF, Hugo C, Thomusch O, Neumann AU, Reinke P, Babel N. *The genetic predisposition of natural killer cell to BK virus-associated nephropathy in renal transplant patients*. *Kidney Int.* 2013 Aug;84(2):359-65
(Impact factor: *Kidney International* 2013: 8,52)

Publikation 2:

Rambal V, Müller K, Dang-Heine C, Sattler A, Dziubianau M, **Weist B**, Luu SH, Stoyanova A, Nickel P, Thiel A, Neumann A, Schweiger B, Reinke P, Babel N. *Differential influenza H1N1-specific humoral and cellular response kinetics in kidney transplant patients*. *Med Microbiol Immunol.* 2014 Feb;203(1):35-45
(Impact factor: *J. o. Medical Microbiology and Immunology* 2013: 2,433)

Publikation 3:

Weist BJ, Schmueck M, Fuehrer H, Sattler A, Reinke P, Babel N. *The role of CD4⁺ T cells in BKV-specific T cell immunity*. *Med Microbiol Immunol.* 2014 Jul 23.
(Impact factor: *J. o. Medical Microbiology and Immunology* 2013: 2,433)

Publikation 4:

Weist BJ, Wehler P, El Ahmad L, Schmueck M, Reinke P, Babel N. *A revised strategy for monitoring BKV-specific cellular immunity in kidney transplant patients*. Accepted at *Kidney Int.* 21/05/2015
(Impact factor: *Kidney International* 2013: 8,520)

5. Druckexemplare der ausgewählten Publikationen

„The genetic predisposition of natural killer cell to BK virus-associated nephropathy in renal transplant patients.“

Trydzenskaya H¹, Juerchott K, Lachmann N, Kotsch K, Kunert K, Weist B, Schönemann C, Schindler R, Nickel P, Melzig MF, Hugo C, Thomusch O, Neumann AU, Reinke P, Babel N.

Kidney Int. 2013 Aug;84(2):359-65. doi: 10.1038/ki.2013.59. Epub 2013 Mar 13.

URL: <http://dx.doi.org/10.1038/ki.2013.59>

„Differential influenza H1N1-specific humoral and cellular response kinetics in kidney transplant patients.“

Rambal V¹, Müller K, Dang-Heine C, Sattler A, Dziubianau M, Weist B, Luu SH, Stoyanova A, Nickel P, Thiel A, Neumann A, Schweiger B, Reinke P, Babel N.

Med Microbiol Immunol. 2014 Feb;203(1):35-45. doi: 10.1007/s00430-013-0312-3. Epub 2013 Sep 22.

URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s00430-013-0312-3>

„The role of CD4(+) T cells in BKV-specific T cell immunity.“

Weist BJ¹, Schmueck M, Fuehrer H, Sattler A, Reinke P, Babel N.

Med Microbiol Immunol. 2014 Dec;203(6):395-408. doi: 10.1007/s00430-014-0348-z. Epub 2014 Jul 23.

URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s00430-014-0348-z>

„A revised strategy for monitoring BKV-specific cellular immunity in kidney transplant patients.“

Weist BJ¹, Wehler P¹, El Ahmad L¹, Schmueck-Henneresse M¹, Millward JM¹, Nienen M¹, Neumann AU¹, Reinke P², Babel N³.

Kidney Int. 2015 Jul 29. doi: 10.1038/ki.2015.215. [Epub ahead of print]

URL: <http://dx.doi.org/10.1038/ki.2015.215>

6. Lebenslauf

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

7. Publikationsliste

5.1 Publikationen

Publikation 1: Trydzenskaya H, Juerchott K, Lachmann N, Kotsch K, Kunert K, **Weist B**, Schönemann C, Schindler R, Nickel P, Melzig MF, Hugo C, Thomusch O, Neumann AU, Reinke P, Babel N. *The genetic predisposition of natural killer cell to BK virus-associated nephropathy in renal transplant patients*. *Kidney Int.* 2013 Aug;84(2):359-65

Publikation 2: Rambal V, Müller K, Dang-Heine C, Sattler A, Dziubianau M, **Weist B**, Luu SH, Stoyanova A, Nickel P, Thiel A, Neumann A, Schweiger B, Reinke P, Babel N. *Differential influenza H1N1-specific humoral and cellular response kinetics in kidney transplant patients*. *Med Microbiol Immunol.* 2014 Feb;203(1):35-45

Publikation 3: **Weist BJ**, Schmueck M, Fuehrer H, Sattler A, Reinke P, Babel N. *The role of CD4⁺ T cells in BKV-specific T cell immunity*. *Med Microbiol Immunol.* 2014 Jul 23.

Publikation 4: **Weist BJ**, Wehler P, El Ahmad L, Schmueck M, Reinke P, Babel N. *A revised strategy for monitoring BKV-specific cellular immunity in kidney transplant patients*. Accepted at *Kidney Int.* 21/05/2015

Publikation 5: Schmueck-Henneresse M, Sharaf R, Vogt K, **Weist BJ**, Landwehr-Kenzel S, Fuehrer H, Jurisch A, Babel N, Rooney CM, Reinke P, Volk HD. *Peripheral Blood-Derived Virus-specific Memory Stem T Cells Mature to Functional Effector Memory Subsets with Self-Renewal Potency*. *J Immunology.* 2015 Apr; pii: 1402090 [Epub ahead of print]

5.2 Vorträge

- American Transplantation Congress 2013, Seattle, USA:

“Non-Invasive Diagnostic Markers for Differentiation between BKV-Associated Nephropathy and Acute Rejection in Renal Transplant Patients”

- American Transplantation Congress 2015, Philadelphia, USA:

“Concerted T-cell activity against early and late BKV-antigens is necessary for viral clearance”

- ESOT 2015, Brüssel, Belgien:

“Concerted T-cell activity against early and late BKV-antigens is necessary for viral clearance”

- DGfN 2015, Berlin, Deutschland:

“Concerted T-cell activity against early and late BKV-antigens is necessary for viral clearance”

- DTG 2015, Dresden, Deutschland:

“Non-Invasive Diagnostic Markers for Differentiation between BKV-Associated Nephropathy and Acute Rejection in Renal Transplant Patients”

5.3. Poster Präsentationen

- American Transplantation Congress 2010, San Diego, USA:

“Molecular Pattern of a Polyomavirus infection in human renal allografts”

- American Transplantation Congress 2011, Philadelphia, USA:

“A new approach for the ex vivo generation of low frequent antigen specific T cells - Polyomavirus BK model”

- Joint Annual Meeting SIICA/DGfI 2011, Riccione, Italien:

“Dissection of the cellular responses of rarely occurring virus-specific T-cells - Polyomavirus BK as a model”

- American Transplantation Congress 2012, Boston, USA:

“Control and abatement of Polyomavirus BK - It's not the CD8⁺ but multifunctional and cytolytic CD4⁺ T cells”

- Auszeichnung mit dem “Young Investigator Award” der American Society of Transplant Surgeons (ASTS) und der American Society of Transplantation (AST) -

- American Transplantation Congress 2013, Seattle, USA:

“Phenotype and functionality of BKV-specific T cells are differently affected by distinct immunosuppressive drugs”

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den vielen Menschen bedanken, die mich in meiner Promotion begleitet haben. Dabei möchte ich mich insbesondere bei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Nina Babel für die Möglichkeit bedanken in Ihrem Arbeitskreis Promovieren zu können. Sie haben mich gefördert, gefordert und mir dabei sowohl fachlich als auch menschlich die nötige Unterstützung für das Erarbeiten dieser Dissertation gegeben. Mein weiterer Dank gilt Frau Prof. Dr. Petra Reinke, die mich mit Wärme und mit konstruktiver Kritik unterstützt und angeregt hat sowie Dr. Michael Schmück der mich zu Beginn meiner Promotion in die Methodik eingeführt hat und mir auch danach immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Auch meinen Kollegen bin ich zu Dank verpflichtet. Mit euch war es immer fachlich anregend, lustig und gesellig. Für finanzielle Unterstützung danke ich der Charité.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Freunden und meiner Familie bedanken. Ich bin froh so viele tolle Wegbegleiter zu haben die mein Leben bunt und schön machen. Ihr Geschwister, Ihr seid die besten Brüder und Schwestern die ich mir nur wünschen kann und das Salz in der Suppe. Meinen Eltern kann ich gar genug dafür danken, dass sie mir immer den Rückhalt und die Freiheit gegeben haben zu erreichen was ich mir wünsche und zu werden wer ich bin.