

# **Die Reaktivierungskinetik humaner Polyomaviren bei Nierentransplantierten und ihre Quantifizierung mittels differentieller Real-Time-PCR**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Humanmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von Lena K. Peters  
Aus Gießen/Hessen

Gießen 2008

Aus dem Institut für Medizinische Virologie  
des Zentrums für Medizinische Mikrobiologie und Virologie  
Leiter: Prof. Dr. phil. nat. Wolfram H. Gerlich  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter:  
Prof. Dr. Dr. Gerlich

Gutachter:  
Prof. Dr. Fink

Tag der Disputation:  
10.03.2009

Meinen Eltern  
Anne und Achim  
und  
meinem Großvater  
Erich Dietz  
gewidmet

Ich erkläre: ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Lena K. Peters

# Inhalt

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>7</b>
1.1	Polyomaviren	7
1.1.1	Entdeckung und Einteilung	7
1.1.2	Aufbau der Polyomaviren	8
1.1.2.1	Viruspartikel	8
1.1.2.2	Genom und Genomorganisation	9
1.1.2.3	Replikation/ viraler Lebenszyklus	10
1.2	Humanpathogene Polyomaviren: BK- und JC-Viren	12
1.2.1	Epidemiologie und Übertragung	12
1.2.2	Klinik	13
1.2.2.1	Manifestationen bei HIV-Infizierten	14
1.2.2.2	Manifestationen unter therapeutischer Immunsuppression	14
1.2.2.3	Autoimmunerkrankungen und Tumore	18
1.2.3	Diagnostik	19
1.2.3.1	Diagnostische Verfahren bei PML durch JC-Virus-Infektion:	19
1.2.3.2	Diagnostische Verfahren bei BK-Virus-Infektionen:	19
1.2.4	Therapie	23
1.3	Fragestellung	24
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>25</b>
2.1	Material	25
2.1.1	Patientenurin, -plasma und -serum	25
2.1.2	Oligonukleotide	25
2.1.3	Chemikalien	26
2.1.4	PCR-Reagenzien	26
2.1.5	Puffer	27
2.1.6	Längenstandard	27
2.1.7	Plasmid	27
2.1.8	Geräte	27
2.2	Methoden	28
2.2.1	Extraktion viraler Nukleinsäuren	28
2.2.2	Quantifizierung viraler Nukleinsäure mittels real-time PCR	28
2.2.3	Differenzierung viraler Nukleinsäure mittels Schmelzkurvenanalyse	32
2.2.4	Praktische Durchführung der LC-PCR	35
2.2.4.1	Real-time PCR von BKV- und JCV-DNA	36
2.2.4.2	Real-time PCR von SV 40-DNA	36
2.2.5	Agarose-Gelelektrophorese und Sequenzierung	37
2.2.6	Restriktionsverdau zur Linearisierung von Polyomaplasmiden	38
2.2.7	Elution aus Agarosegelen	38
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>39</b>
3.1	Etablierung der differentiellen real-time PCR	39
3.1.1	Primer-Probe-Sets, Urinproben mit oder ohne EDTA	39
3.1.2	Optimierung der PCR-Bedingungen	39
3.1.3	Kalibrierung/Sensitivität	41
3.1.4	Intertestgenauigkeit	42
3.1.5	Spezifitätskontrolle	42
3.1.5.1	Schmelzkurvenanalyse	42

3.1.5.2	Sequenzvergleiche	44
3.1.5.3	PCR-Lauf mit SV40	44
3.1.5.4	Sequenzierung	46
3.2	Testung klinischer Proben	48
3.2.1	Qualitative Ergebnisse	48
3.2.2	Quantitative Ergebnisse	48
3.2.3	BKV-Reaktivierungskinetiken bei Patienten	49
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>62</b>
4.1	Nachweis von BKV-Infektionen	62
4.2	LC-PCR Methode	63
4.3	Bedeutung des JCV für die PAN	64
4.4	Bedeutung der BKV-Ausscheidung für den Nachweis der PAN	65
4.5	Prognostischer Wert der BK-Virurie	67
4.6	Prognostischer Wert der BK-Virämie	68
4.7	Ausblick	69
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>71</b>
<b>6</b>	<b>Appendix</b>	<b>80</b>
6.1	Abkürzungsverzeichnis	80
6.2	Zusammenfassung	82
6.3	Abstract	83
6.4	Lebenslauf	85
6.5	Danksagung	86

# 1 Einleitung

## 1.1 Polyomaviren

### 1.1.1 Entdeckung und Einteilung

Die Familie der Polyomaviridae enthält kleine Viren ohne Hülle, die als Genom eine zirkuläre, doppelsträngige DNA enthalten. Aufgrund dieser molekularen Charakteristika wurden sie zunächst mit den Papillomviren in einer Familie, den Papovaviridae, zusammengefasst. Mittlerweile hat man jedoch deutliche Unterschiede im Genomaufbau, bei der Replikation und der Molekularbiologie der Polyoma- und der Papillomviren gefunden und ordnet sie deshalb seit 1998 (ICTV Meeting, San Diego 1998) zwei voneinander getrennten Virusfamilien zu (Imperiale MJ, Major EO, 2007).

Die Gattung Polyomavirus wird weiter in verschiedene Spezies unterteilt. Hierzu zählen u.a. SV40 (Simian Virus 40) und die humanpathogenen Vertreter BK- und JC-Virus sowie viele weitere Spezies, die in den unterschiedlichsten Tieren wie Affen, Rind, Kaninchen, Hamster, Ratte, Maus und Wellensittich entdeckt wurden (Van Regenmortel MHV et al., 2000).

SV40 und das Polyomavirus der Maus sind die bisher am besten untersuchten Viren der Polyomaviridae. Sie dienen als Modell für onkogene Viren, da sie bei Inokulation im nichtnatürlichen Wirt Tumoren induzieren (Stewart SE et al., 1958). Die tumorerzeugenden Eigenschaften des Mauspolyomavirus wurden 1953 von Ludwig Gross entdeckt. Er übertrug Zellextrakte leukämiekranker Mäuse auf gesunde Tiere und beobachtete, dass unterschiedliche Tumorerkrankungen, wie Leukämien und Parotistumoren, hervorgerufen werden können (Gross L, 1953). 1957/58 gelang Sarah Stewart und Bernice Eddy die Isolierung des Polyomavirus der Maus durch die Beimpfung von Mausfibroblastenkulturen, in denen sie einen cytopathischen Effekt beobachteten (Stewart SE et al., 1958). Nach Übertragung des Virus auf neugeborene Mäuse stellten sie 24 verschiedene Tumortypen fest (Stewart SE et al., 1958). Der Name Polyoma leitet sich von den griechischen Wörtern πολυ für „viele“ und -όμα, dem Suffix für „Tumore“ ab.

## 1.1.2 Aufbau der Polyomaviren

### 1.1.2.1 Viruspartikel

Polyomaviren sind doppelsträngige DNA-Viren ohne Hüllmembran (s. Abb.1). Die infektiösen Viruspartikel sind Capside mit einem Durchmesser von 49,5 nm und einem ikosaedrischen Aufbau (Baker TS et al., 1999). Sie besitzen drei virale Strukturproteine: Virus-Protein [VP]1, VP2 und VP3, wobei VP1 die Hauptkomponente darstellt. Das VP1-Strukturprotein vermittelt die Adsorption der Viren an die Rezeptoren der Zellmembran. Die neutralisierenden Antikörper sind gegen Epitope des VP1 gerichtet (Imperiale MJ, Major EO, 2007). Bei dem humanpathogenen BK-Virus ist man aufgrund serotypischer Unterschiede zwischen BK-Isolaten auf antigene Varianten der Capsid-VP1-Epitope aufmerksam geworden (Jin L et al., 1993). Serologische und genetische Studien legen eine Einteilung in vier verschiedene Subtypen nahe: I (Prototyp PT, Dunlop Dun, Gardner GS und MM), II (SB), III (AS) und IV (IV und MG), wovon Typ I am weitesten verbreitet ist (Jin L et al., 1993).

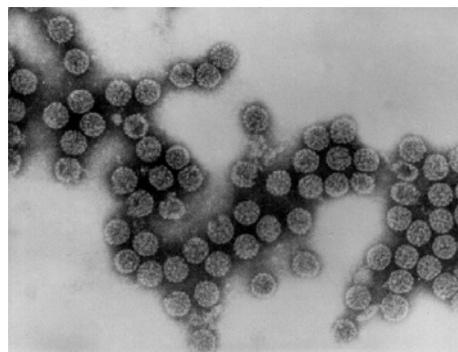


Abb. 1:  
Transmissionselektronenmikroskopische  
Aufnahme des Simian Virus 40  
(Aus: <http://pathmicro.med.sc.edu/lecture/images/sv40.jpg>)

Ein Viruspartikel ist aus 72 Capsomeren zusammengesetzt, die wiederum aus pentameren Komplexen des VP1 bestehen (Liddington RC et al., 1991; Rayment I et al., 1982). VP2 und VP3 sind nur in geringen Mengen in den Capsiden vertreten, sie sorgen für einen geordneten Zusammenbau des Capsids. Ein viertes Strukturprotein, welches ebenfalls in geringer Anzahl vorliegt, ist das Protein LP1 oder Agnoprotein. Phosphorylierte Formen dieses Proteins finden sich während des Replikationszyklus im Zytoplasma der Zelle, unphosphorylierte Formen jedoch im Zellkern. Man vermutet daher, dass es sich beim Agnoprotein um ein Shuttleprotein handelt, das je nach Phosphorylierungsstatus vom Cytoplasma in den Zellkern und zurück transportiert wird und die Lokalisation des VP1 im Zellkern bewirkt (Carswell S et al.,

1986). Durch seine Interaktion mit dem Capsidprotein VP1 in der Zelle nimmt es sehr wahrscheinlich Einfluss auf die Virus-Morphogenese.

### 1.1.2.2 Genom und Genomorganisation

Das zirkuläre doppelsträngige DNA-Genom der Polyomaviren hat eine Länge von ca. 5200 Basenpaaren [bp] (5243 beim SV40, 5153 beim BK- bzw. 5130 beim JC-Virus) (Imperiale MJ, Major EO, 2007). Es ist an vier zelluläre Histone (H2A, H2B, H3, H4) gebunden und bildet so einen Nukleoproteinkomplex.

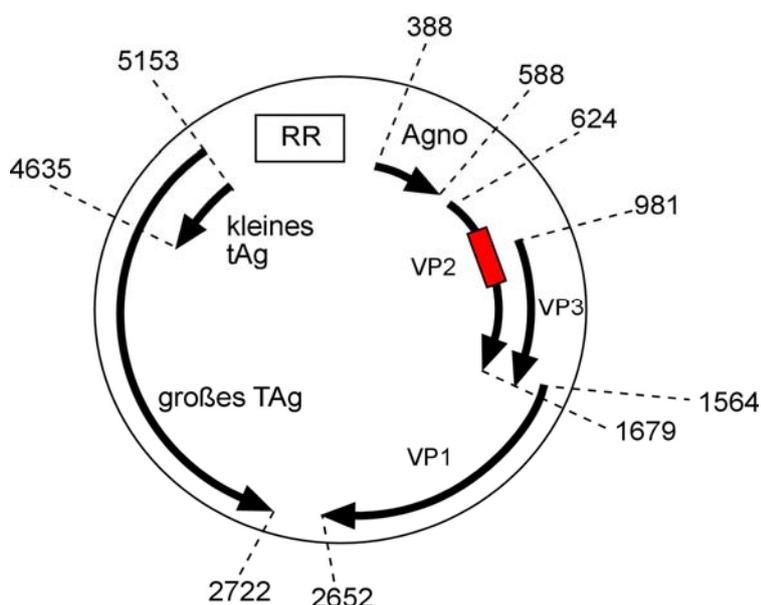


Abb. 2: Schematische Darstellung des BKV-Genoms. Sie stellt die regulatorische Region (RR) dar, die frühe, für großes T- und kleines t-Antigen kodierende Region, und die späte Region, die die drei Strukturproteine VP1, VP2 und VP3 sowie das Agnoprotein kodiert. Der von unserer LC-PCR amplifizierte Bereich ist rot gekennzeichnet. (Positionen nach Referenzsequenz NC\_001538).

Nach dem Zeitpunkt der Genexpression und der Orientierung der Leserahmen lässt sich das DNA-Genom in zwei Segmente einteilen. Man unterscheidet die frühe, für großes T-Antigen [T-Ag] und kleines t-Antigen [t-Ag] (Tumor-Antigene) kodierende Region (Crawford L et al., 1978), und die späte Region, die die drei Strukturproteine VP1, VP2 und VP3 sowie das Agnoprotein kodiert (Imperiale MJ, Major EO, 2007) (s. Abb. 2). Dazwischen befindet sich eine nichtkodierende Region, die regulatorische Sequenzen wie den Replikationsursprung und die Promotor- und Enhancerelemente der frühen und späten Gene enthält (Imperiale MJ, Major EO, 2007). Sowohl das virale T-Antigen als auch verschiedene zelluläre Transkriptionsfaktoren [TF] binden dort zur Regulation der Transkription und Replikation. Trotz weitreichender Parallelen

in der Genomorganisation zwischen dem Simian Polyomavirus SV40 und den humanpathogenen Polyomaviren BKV und JCV, zeigen sich im Bereich der nichtkodierenden Nukleotidsequenzen signifikante Unterschiede der Genomorganisation. Die Hypervariabilität der regulatorischen Region ist ein typisches Merkmal der Polyomaviren, vor allem der humanpathogenen Polyomaviren BKV und JCV, die vielfältige Varianten dieser Region aufweisen, je nachdem aus welchem Gewebe sie isoliert wurden. Der Prototyp-Stamm des JCV, genannt Mad-1, besitzt in seiner regulatorischen Region zwei aufeinander folgende, identische Tandemrepeat-Sequenzen von 98 Nukleotiden Länge, die jeweils eine Verdopplung der TATA-Sequenz enthalten (Frisque RJ et al., 1984). Aus Urin gewonnenes JCV besitzt eine regulatorische Region, die nicht die klassische Tandemrepeat-Struktur aufweist. Die lineare Anordnung der aus Urin gewonnenen Sequenzen wird als Archetyp-Struktur bezeichnet (Frisque RJ et al., 1984 und Yogo Y et al., 1990). BKV zeigt ein ähnliches Phänomen der Archetyp-Sequenzen, die im Urin vorgefunden werden. BK-Viren mit weiteren unterschiedlichen Repeat-Sequenzen können in Nieren und anderen Geweben identifiziert werden (Rubinstein R et al., 1987).

Interessanterweise sind weder BKV noch JCV mit regulatorischen Sequenzen vom Archetyp zu einem effizienten Wachstum in Zellkultur fähig, obwohl diese Stämme in der Natur weit verbreitet sind (Imperiale MJ, Major EO, 2007). Man geht daher davon aus, dass die Archetyp-Stämme der humanen Polyomaviren, die in der menschlichen Bevölkerung zirkulierenden Stämme darstellen, von welchen sich durch Neuordnung der regulatorischen Region Varianten bilden. Diese Neuordnungen der nicht kodierenden regulatorischen Region verändern Anzahl und Lokalisation der TF-Bindestellen, wie beispielsweise dem SP1-, NF1-, Östrogen- und Glukokortikoidrezeptor (Moens U et al, 2001). Anzahl, Lokalisation und Art der TF-Bindestellen und das Vorhandensein der entsprechenden zellulären Transkriptionsfaktoren bestimmen die Effizienz des viralen Wachstums und die Zelltypspezifität der viralen Partikel.

### 1.1.2.3 Replikation/ viraler Lebenszyklus

Das Andocken der Polyomaviren an die Rezeptoren ihrer Zielzellen erfolgt über die Pentamere des VP1-Strukturproteins. Im Falle des BKV stellen die Aminosäuren 61-83 des VP1 die antigenen Determinanten der BKV-Subtypen dar (Jin L et al., 1993).

Die Wirtszellrezeptoren für BK-Viren sind noch unbekannt. Man vermutet jedoch, dass der BK-Rezeptor Glykolipide mit  $\alpha$ -(2,3)-verknüpfte Sialinsäure enthält. Für das JC-Virus ist beschrieben, dass es  $\alpha$ -(2,6)-verknüpfte Sialinsäurereste an Glykoproteinen zum Andocken an die Zellmembran verwendet (Liu CK et al., 1998). Nach der Endocytose wird das Viruspartikel unter Umgehung des lysosomalen Weges zum Zellkern transportiert, wo es zur Freisetzung des Virusgenoms kommt (s.Abb.3) (Drachenberg CB et al., 2003). Es folgt die Transkription der frühen Gene, die für die verschiedenen T-Antigene codieren. Virale Strukturproteine sind für die frühe Genexpression nicht nötig. Die m-RNA-Synthese erfolgt durch die zelluläre RNA-Polymerase II. Durch differenzielles Spleißen der mRNAs entstehen aus einem RNA-Vorläufermolekül die verschiedenen T-Antigene. Wurden ausreichende Mengen an großem T-Antigen gebildet, so bindet dies an Sequenzelemente im frühen Promotor und reduziert die Anzahl an frühen Transkripten. Die Aktivität der Promotoren wird durch Enhancer verstärkt.

Im Zusammenspiel mit zellulären Transkriptionsfaktoren reguliert das große T-Antigen desweiteren die DNA-Replikation sowie die Expression der späten Gene (Moens U et al., 2001).

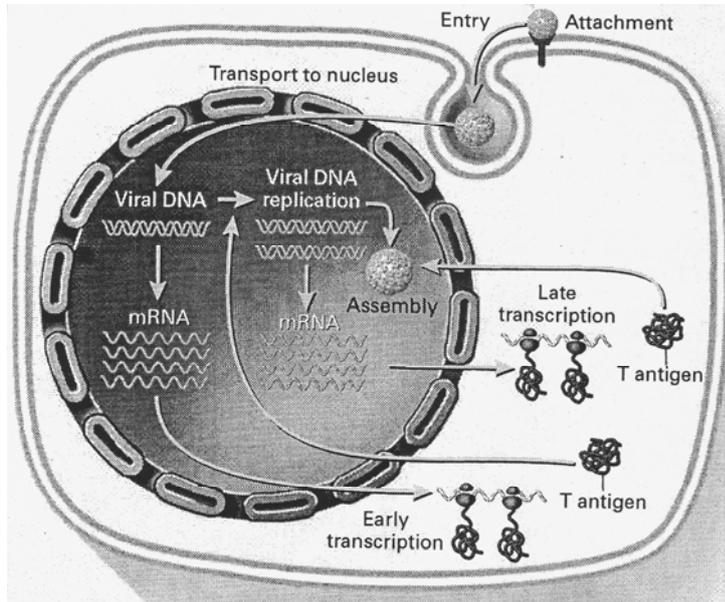


Abb.3: Infektion und Replikation humaner Polyomaviren (nach Fig.1, Fishman JA, BK Virus Nephropathy – Polyomavirus Adding Insult To Injury. N. Engl. J. Med. 2002; 347: 527-530).

Durch seine Helicaseaktivität schmilzt das T-Antigen die doppelsträngige DNA auf und bildet am Replikationsursprung eine Replikationsblase. Im Bereich dieser Blase bindet der zelluläre Replikationskomplex, bestehend aus einzelstrangbindenden

Proteinen, DNA-Primase und DNA-Polymerase- $\alpha$ . Er initiiert die bidirektionale Replikation. Erst nachdem die DNA-Replikation begonnen hat erfolgt die Transkription der späten viralen Gene für die Strukturproteine VP1-3 und das Agnoprotein. Auch hier folgen nach der RNA-Synthese alternative Spleißvorgänge. Der Zusammenbau der verschiedenen viralen Bestandteile findet im Zellkern statt. Dazu assoziieren die neu gebildeten DNA-Doppelstränge mit den zellulären Histonen zu Minichromosomen und mit den Strukturproteinen zu Nachkommenviren. Um nach ihrer Synthese in den Kern transportiert zu werden, verfügen die Capsidproteine über entsprechende Kernlokalisierungssignale. Die Virusvermehrung führt zum Tod der Zelle durch Lyse und zur Freisetzung der Virionen.

## 1.2 Humanpathogene Polyomaviren: BK- und JC-Viren

### 1.2.1 Epidemiologie und Übertragung

Der Mensch ist der natürliche Wirt für zwei Polyomaviren, das BK- und das JC-Virus (Polyomavirus hominis 1 und 2). Das JC-Virus wurde 1971 aus dem Gehirn eines an progressiver multifokaler Leukoencephalopathie [PML] erkrankten Hodgkin-Lymphom-Patienten mit den Initialen J. C. isoliert (Padgett BL et al., 1971). Das BK-Virus isolierte man noch im selben Jahr aus dem Urin eines Nierentransplantatempfängers mit den Initialen B. K., der immunsuppressiv behandelt wurde (Gardner SD et al., 1971). Es folgten serologische Untersuchungen, die zeigten, daß fast 100 Prozent der erwachsenen Bevölkerung Antikörper gegen das BK-Virus und etwa 80 Prozent aller Erwachsenen Antikörper gegen das JC-Virus aufweisen (Weber T et al., 1997). Die Serokonversion erfolgt meist in den frühen Lebensjahren, im Mittel zwischen dem 5. und 7. Lebensjahr (Taguchi F et al., 1982). Eine hohe Durchseuchung und geringe Pathogenität sprechen für eine evolutionsbiologisch etablierte Adaptation (Hirsch HH et al., 2004). Tatsächlich können Migrationsbewegungen der letzten 100000 Jahre anhand von Polyomavirus-Geno-Subtypen nachvollzogen werden- so z.B. die Wanderungsbewegungen indianischer Ethnien von Afrika über Asien und Alaska nach Amerika, die zum Auftreten der europäischen und westafrikanischen Genotypen unter der heutigen amerikanischen Bevölkerung geführt haben (Agostini HT et al., 1997; Hirsch HH et al., 2004).

Die Übertragungswege der Polyomaviren sind noch nicht vollständig geklärt. Die

Tatsache, dass mit dem Urin eine große Anzahl freier Viren ausgeschieden wird und auch im Abwasser hohe Viruskonzentrationen nachweisbar sind, legt die Vermutung nahe, dass Schmierinfektionen eine Verbreitungsrouten darstellen (Sundsford A et al., 1994). Da BKV- und JCV-DNA ebenfalls in menschlichem Tonsillengewebe nachgewiesen werden konnte, geht man davon aus, dass die Viren auch durch Tröpfcheninfektion übertragen werden können (Goudsmit J et al., 1982; Monaco MC et al., 1998). Eine transplazentare Übertragung wurde aufgrund des Nachweises von spezifischem IgM in Nabelschnur-Blutproben und von BKV-DNA in fetalem und plazentarem Gewebe ebenfalls vermutet (Knowles WA, 2001; Brown DW et al., 1984; Pietropaolo V et al., 1998). Weitere potentielle Übertragungswege schließen Sperma, die Transfusion von Blutprodukten und Organ-Transplantationen, insbesondere Nierentransplantationen, ein (Zambrano A et al., 2002; Dolei A et al., 2000; Andrews CA et al., 1988; Shah KV et al., 2000).

Die Genome der Viren persistieren nach dem ersten Kontakt in den Zielorganen. Dazu gehören die Epithelien des Urogenitaltrakts (Padgett BL et al., 1983), das ZNS, die primären und sekundären lymphoiden Organe mit dem Knochenmark, den Tonsillen, den Lymphknoten und Zellen des peripheren Blutes (Houff SA et al., 1988). Die Infektion von Leukozyten spielt vermutlich eine wesentliche Rolle bei der Verbreitung des Virus in die Zielorgane. So ließen sich z.B. JC-Virus-DNA in peripheren Blutlymphozyten und infizierte B-Zellen im Gehirn von PML-Patienten nachweisen (Major EO et al., 1992).

### 1.2.2 Klinik

In immunkompetenten gesunden Individuen verläuft die persistierende BK und JC Virusinfektion in den allermeisten Fällen symptomfrei mit geringer Expression viraler Proteine (Dörries K, 2004). Die Primärinfektion mit BK-Viren bei Kindern mit intaktem Immunsystem verursacht gelegentlich respiratorische Erkrankungen und Zystitis (Sundsford A et al., 1994). Beide Virustypen persistieren vorrangig im Urogenitaltrakt (Shah KV et al. 1973; Imperiale MJ, Major EO, 2007). Veränderungen der Immunkompetenz, z.B. während der Schwangerschaft, im hohen Alter oder aufgrund immunologischer Defekte sind mit einer vermehrten Präsenz des Virus im Urin, Serum oder Liquor cerebrospinalis verbunden (Coleman DV et al. 1983; Kitamura T et al. 1994). Hält ein immunologischer Defekt über längere Zeit an, kann die

kontrollierte, symptomlose Reaktivierung in eine unkontrollierte Vermehrung des Virus übergehen, durch die das Gewebe der Zielorgane zytolytisch zerstört wird (Dörries K, 2004).

#### 1.2.2.1 Manifestationen bei HIV-Infizierten

Eine wichtige Polyomavirus-Erkrankung bei AIDS-Patienten ist die JCV-vermittelte PML. Man geht davon aus, dass 55 – 85% aller PML-Fälle auf eine durch AIDS verursachte Immunsuppression zurückzuführen sind. Etwa 5 – 10% der HIV-infizierten Patienten sind von PML betroffen (Imperiale MJ, Major EO, 2007). Bei einer Erkrankung an PML zeigen sich früh Seh- und Sprachstörungen sowie partielle Lähmungen. Innerhalb von 6 Monaten kommt es in den meisten Fällen zu fortschreitender Demenz, sensorischen Störungen und zum Tod (Major EO et al., 1992). Verantwortlich für diese Symptome ist die lytische JC-Virus-Infektion der Oligodendrozyten, deren Zerstörung zur Entmarkung führt (Imperiale MJ, Major EO, 2007). Das histopathologische Bild der PML wird von einem Dreiklang aus multifokaler Demyelinisierung, hyperchromatisch veränderten, vergrößerten Kernen der Oligodendrozyten und vergrößerten Astrozyten mit gelappten oder auch mitotischen Kernen bestimmt (Dörries K, 2004).

Klinische BKV-Manifestationen sind bei AIDS-Patienten, trotz häufiger Reaktivierung, selten (Hirsch HH et al., 2003), ein einzelner Fall einer BKV-Enzephalitis wurde in der Literatur beschrieben (Bratt G et al., 1999).

#### 1.2.2.2 Manifestationen unter therapeutischer Immunsuppression

Empfänger von Knochenmark- und Nierentransplantaten mit entsprechender immunsuppressiver Therapie gehören zur Hauptrisikogruppe für BKV-assoziierte Befunde. Bei diesen Patienten kommt es unter dem Einfluss der Immunsuppressiva gehäuft zur Reaktivierung einer latenten Infektion. Die asymptomatische Reaktivierung ist hierbei die häufigste Manifestation einer BKV-Infektion.

Die mit BKV assoziierten Krankheitsbilder immunsupprimierter Patienten sind sehr vielfältig und umfassen hämorrhagische Zystitis, Ureter-Strikturen, Infektionen des ZNS (wie z.B. Enzephalitis, Meningoenzephalitis), Niereninfektionen (z.B. interstitielle Nephritis und Nephropathie), Pneumonitis, Retinitis, disseminierte Vaskulopathie und Hepatitis (Reploeg MD et al., 2001).

Im Folgenden werden die bei nierentransplantierten Patienten bisher am besten untersuchten Krankheitsbilder näher erläutert:

*Abnehmende Transplantat-Funktion:* Die meisten Patienten haben scheinbar keine Symptome- außer einem stetig steigenden Serum-Kreatinin-Spiegel mit fortschreitendem Funktionsverlust des Nierentransplantats (Hogan TF et al., 1980; Binet I et al., 1999; Nickeleit V, Klimkait T et al., 2000; Ramos E et al., 2002).

*Interstitielle Nephritis und Nephropathie:* Die Entwicklung einer Polyomavirus-assoziierten Nephropathie [PAN] stellt unter den Polyomavirus-assoziierten Funktionsstörungen transplantierte Nieren eine besondere Bedrohung dar. Die Ergebnisse einer prospektiven Studie mit 78 Nierentransplantat-Empfängern, die eines oder mehrere der neueren, potenteren Immunsuppressiva (Tacrolimus oder Mykophenolat) erhalten haben, zeigen, dass lokale Reaktivierungen des BKV im Urogenitaltrakt bei 30%-40% der Patienten vorkommen und immer der Entwicklung einer Virämie vorausgehen (Hirsch HH et al., 2002). Von den ca. 15% der Nierentransplantat-Empfänger, die eine Virämie entwickelten, kam es bei einem relativ hohen Anteil zu einer histologisch manifesten PAN, während der Anteil, gemessen an allen Nierentransplantat-Empfängern, mit 5%-8% eher gering ist. Es scheint folglich die Mehrheit der Nierentransplantat-Empfänger eine reaktivierte Infektion kontrollieren zu können, ohne, dass diese zu einer invasiven Nierenerkrankung fortschreitet.

Die spezifischen Faktoren, die das Fortschreiten einer reaktivierten Infektion im Urin zu einer Virämie und anschließenden PAN begünstigen, sind noch nicht ausreichend definiert (s. Abb.5).

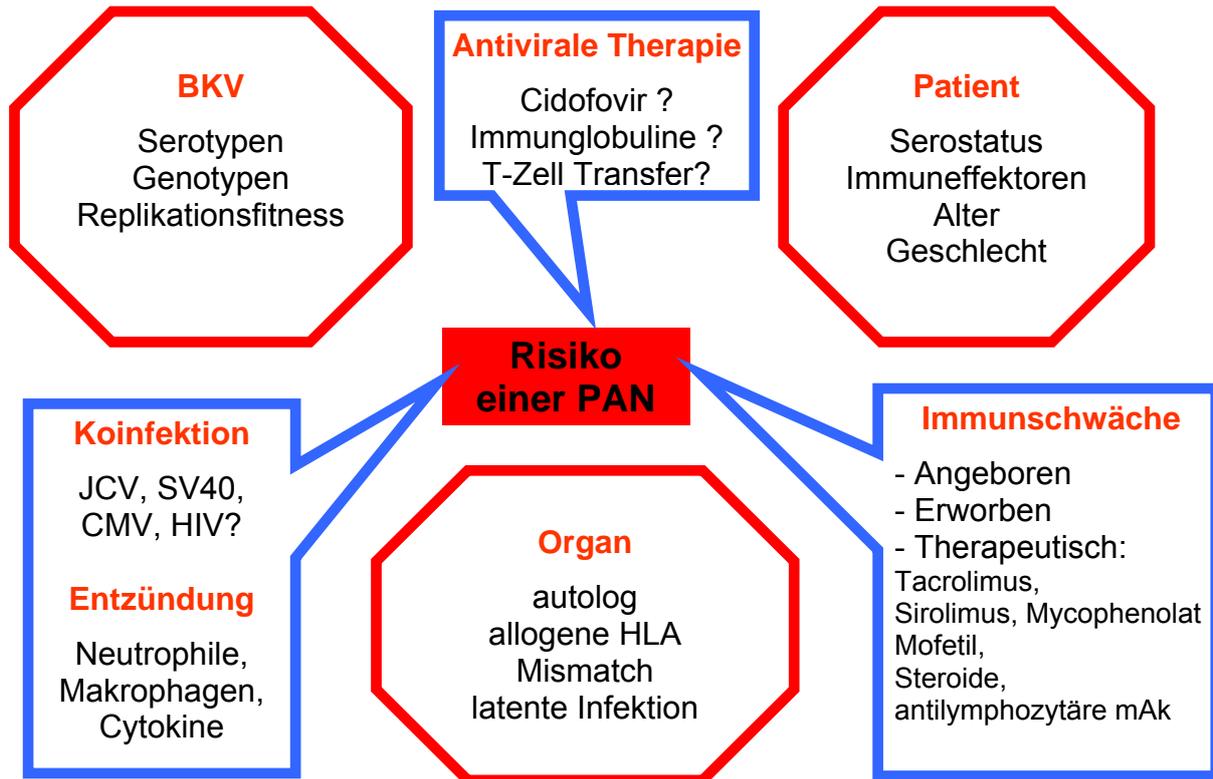


Abb.5: Risikofaktoren und Modulatoren der PAN (Schüttler CG verändert nach Abb. 2 Hirsch HH et al., 2003)

Es gibt die Vorstellung eines Zwei-Phasen-Modells für die Entstehung einer PAN. In der ersten Phase wird BKV unter dem Einfluss der Immunsuppression aus der Latenz reaktiviert, jedoch zunächst auf relativ niedrigem Level. Kommen dann weitere Faktoren hinzu (z.B. Nierengewebsverletzungen durch Ischämie oder Abstoßung) besteht ein erhöhtes Risiko für das Fortschreiten der reaktivierten Infektion zur PAN. In einer prospektiven Studie wurden Histoinkompatibilitäten und Steroid-Stoß-Therapien bei Abstoßung mit einem erhöhten PAN-Risiko assoziiert (Hirsch HH et al., 2002). Andere Studien stellen ein höheres Alter, männliches Geschlecht, einen negativen Serostatus vor Transplantation und Immunsuppressions-Regime, die Tacrolimus oder Mykophenolat oder Prednison enthalten als mögliche Risikofaktoren dar (Ramos E et al., 2002; Hirsch HH et al., 2002; Ginevri F et al., 2003; Mengel M et al., 2003). Einige Autoren berichten über Neuordnungen der nicht-kodierenden Kontrollregion [RR] des BKV-Genoms in erkranktem Gewebe. Die Signifikanz dieser Entdeckungen für die Pathogenese einer PAN ist jedoch fraglich (Randhawa P et al., 2003; Chen CH et al., 2001).

Bezüglich der Vermutung, dass das Auftauchen der PAN in Zusammenhang mit der Verfügbarkeit neuerer, potenterer Immunsuppressiva steht, lässt sich sagen, dass die meisten der beschriebenen Fälle bei Nierentransplantat-Empfängern auftraten, die eines oder mehrere der Medikamente Tacrolimus, Mykophenolat oder Sirolimus erhielten (Hirsch HH et al., 2003). Des Weiteren konnte an verschiedenen Zentren zeitgleich mit der Einführung der neueren Immunsuppressiva eine gesteigerte Inzidenz der PAN bei Nierentransplantat-Empfängern festgestellt werden (Binet I et al., 1999). Es ist unklar, ob die PAN eine Folge zu starker Immunsuppression aufgrund der potenteren Substanzen ist oder ob ein anderer Zusammenhang zwischen den Substanzen und der PAN besteht. Wenn generell eine zu starke Immunsuppression bei diesen Patienten bestünde, würde man auch für andere opportunistische Infektionen ein erhöhtes Risiko erwarten, wovon jedoch bisher nicht berichtet wurde. Zudem lässt das extrem seltene Auftreten einer PAN in anderen, stärker immunsupprimierten Populationen, die einen höheren Anteil anderer opportunistischer Infektionen haben als Nieren-Transplantat-Empfänger (wie z.B. Stammzell-Transplantat-Empfänger, Lungen-Transplantat-Empfänger), vermuten, dass eine zu starke Immunsuppression nicht der alleinige Faktor für die Pathogenese einer PAN ist. Hinzu kommt, dass die Mehrheit der Nieren-Transplantat-Empfänger, die diese Medikamente erhalten, keine PAN entwickelt, weshalb diese Medikamente nicht ausreichend für die Entwicklung einer PAN zu sein scheinen.

Zur Klärung dieses scheinbaren Zusammenhangs zwischen den neueren Immunsuppressiva und der PAN werden genaue Untersuchungen bezüglich des Anteils der Reaktivierungen im Urin, der Virämien und PANs in verschiedenen, nach Immunsuppressions-Regimen randomisierten, Patientengruppen nötig sein.

*Ureterstenosen:* Als Ursache für Ureterstenosen vermutet man eine von der Blase in Richtung Niere, entlang des Urothels, aufsteigende BKV-Infektion (Gardner SD et al., 1971; Hogan TF et al., 1980; Nickeleit V, Klimkait T et al., 2000; Nickeleit V et al., 1999).

*Mikrohämaturie und hämorrhagische Zystitis:* findet man als initiale Krankheitszeichen am häufigsten bei Knochenmark-Transplantat-Empfängern. Bei diesen Patienten kommt es, meist 2-12 Wochen nach Transplantation, zu einer BKV-Reaktivierung mit der Folge einer hämorrhagischen Zystitis, bei der das Virus die Blasenepithelien zytolytisch zerstört (Bedi A et al., 1995).

### 1.2.2.3 Autoimmunerkrankungen und Tumore

Die BKV-Infektion sei bei der Pathogenese des Systemischen Lupus Erythematoses [SLE] einer der vielen möglichen Trigger der Autoimmun-Antwort (Moens U et al., 2001). Eines der diagnostischen Merkmale der SLE-Aktivität ist die Entstehung von anti-DNA-Antikörpern. Experimentelle Studien mit Kaninchen zeigten, dass T-Ag-DNA-Komplexe diese Autoantikörper-Antwort induzieren können (Moens U et al., 2001).

Die ätiologische Bedeutung der JC- und BK-Viren für die Entstehung von Tumoren ist noch unklar. Im experimentellen Tiermodell konnte gezeigt werden, daß BKV und JCV je nach Übertragungsweg verschiedene maligne Tumore in Nagetieren induzieren (Barbanti-Brodano G et al., 1998). In seltenen Fällen konnte die DNA des BK-Virus in untersuchten Insulinomen, Osteosarkomen und Gehirntumoren verschiedener Histologie (Glioblastom, Astrozytom, Meningeom) nachgewiesen werden (Imperiale MJ, Major EO, 2007). BKV-DNA wurde jedoch ebenfalls in gesundem Hirn, Knochen und peripherem Blut vorgefunden, wodurch es schwierig ist, Schlüsse aus der Präsenz der BKV-DNA in Tumorgewebe zu ziehen (Imperiale MJ, Major EO, 2007). In einem Fallbericht über einen simultan nieren- und pankreastransplantierten Patienten, der ein metastasierendes Blasenkarzinom entwickelte, wurde dieses mit BKV in Verbindung gebracht. Man fand bei diesem Patienten sowohl im Primärtumor als auch in den Metastasen hohe Spiegel an T-Ag, jedoch nicht im Neoplasmen-freien Urothel (Geetha D et al., 2002).

JCV-DNA konnte bislang in malignen Erkrankungen des Nervensystems, bei Leukämien und Lymphomen (Smith M, 1986) und in menschlichen Kolontumoren nachgewiesen werden (Laghi L et al., 1999). Im kolorektalen Tumorgewebe lagen höhere Kopiezahlen der JCV-DNA vor als im nichtinvolvierten Kolongewebe desselben Patienten. Leukämien und Kolontumore werden durch chromosomale Aberrationen und durch mutationsbedingt inaktivierte Tumor-Suppressor-Gene ausgelöst. JCV konnte in Kultur und in einigen Tumorgeweben mit diesen Zelleffekten assoziiert werden (Imperiale MJ, Major EO, 2007).

### 1.2.3 Diagnostik

Die Diagnose Polyomavirus-assoziiierter Erkrankungen wird neben der klinischen Beurteilung und der Bestätigung durch bildgebende Verfahren im Wesentlichen durch den direkten Erregernachweis oder histologische Befunde gesichert.

#### 1.2.3.1 Diagnostische Verfahren bei PML durch JC-Virus-Infektion:

Lässt das klinische Bild eine Erkrankung an PML vermuten, so kann die klinische Beurteilung durch radiologische Verfahren unterstützt werden, die die disseminierte Verteilung und das Ausmaß der Läsionen bestimmen. In der Regel korrelieren die radiologischen Befunde mit der klinischen Symptomatik.

Die Bedeutung der durch Polymerase Kettenreaktion [PCR] ermittelten Viruskonzentration im Liquor der Patienten als diagnostischer Parameter ist noch nicht abschließend geklärt. Im Liquor von Patienten mit PML kann man mittels PCR in etwa 75% der Fälle Nukleinsäure nachweisen (Dörries K, 2004). Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass gerade in der frühen Phase der Erkrankung häufig noch kein Virusnachweis in Liquorproben gelingt (Dörries K, 2004). Zudem beobachtet man JCV-DNA im Liquor von etwa 15% der HIV-infizierten Patienten ohne die typischen klinischen und radiologischen PML-Befunde. Trotz hoher Sensitivität und Spezifität der viralen PCR ist daher die Untersuchung von stereotaktischen Biopsien, in denen man virale Antigene im Bereich der Läsionen und histologische Veränderungen zeigen kann, bis heute die sicherste Methode, eine PML zu diagnostizieren.

#### 1.2.3.2 Diagnostische Verfahren bei BK-Virus-Infektionen:

Zur Diagnostik von BKV-Infektionen bei Nierentransplantat-Empfängern wurde bisher eine Vielzahl von Methoden verwendet. Diese beinhalten den Nachweis von:

- Decoy-Zellen im Urin durch Zytologie.
- Virus-infizierten Tubulusepithelzellen im Urin mittels Elektronenmikroskop.
- viraler DNA im Plasma durch PCR mit und ohne Quantifizierung.
- mRNA des viralen VP1-Proteins im Urin (Ding R et al., 2002).
- Veränderungen des histologischen Bildes mit histologischem Nachweis von BK-Proteinen.

Ein besonderes Augenmerk liegt bei der Diagnostik der BKV-Infektionen auf der Früherkennung einer PAN. Eine BKV-assoziierte interstitielle Nephritis ist oft schwer von einer akuten Abstoßungsreaktion zu unterscheiden (Purighalla R et al., 1995; Randhawa PS et al., 1999; Nিকেleit V, Hirsch HH et al., 2000; Nিকেleit V et al., 2002; Poduval RD et al., 2002, Howell DN et al., 1999; Nিকেleit V et al., 1999). Die fibrotischen Veränderungen der BKV-assoziierten Nephropathie können wiederum zu einem Krankheitsbild führen, das dem einer chronischen Transplantat-Abstoßungsneuropathie gleicht (Randhawa PS et al., 1999). Die Diagnose einer PAN wird oftmals erst aufgrund ausbleibender Funktionsverbesserung des Nierentransplantats trotz gesteigerter immunsuppressiver Therapie oder rein zufällig im Rahmen einer routinemäßigen Nierenbiopsie gestellt. Ist die Diagnose einer PAN mittels Nierenbiopsie gesichert, so ist die Prognose, unabhängig vom klinischen Erscheinungsbild schlecht.

Prognostische Marker einer PAN bei Nierentransplantat-Empfängern sind bisher unbekannt. Jüngere Studienergebnisse lassen jedoch vermuten, dass eine frühe Diagnosestellung mit einer besseren Transplantat-Überlebenschance korreliert (Buehrig CK et al., 2003). Die Mehrzahl der PAN-Fälle tritt innerhalb des ersten Jahres post transplantationem [p. t.] auf, etwa ein Viertel der Fälle werden erst später diagnostiziert (Hirsch HH et al., 2003; Hirsch HH et al., 2002). Zum Nierentransplantat-Verlust aufgrund einer PAN kommt es in 30%-50% der Fälle, an Zentren mit aktiven Screening- und Interventionsverfahren auch seltener (Buehrig CK et al., 2003; Hirsch HH et al., 2002; Drachenberg CB et al., 2004; Ding R et al., 2002; Ramos ER et al., 2003; Agha I et al., 2002; Brennan DC et al., 2005). Die Ergebnisse zweier prospektiver Studien zeigen, dass eine BKV-Ausscheidung im Urin, nachgewiesen entweder durch Urin-Zytologie ("Decoy-Zellen") oder PCR, einer BK-Virämie im Mittel um vier Wochen vorausgeht (Hirsch HH et al., 2002 und Brennan DC et al., 2005) und einer histologisch gesicherten BKV-Nephropathie im Mittel um 12 Wochen (Hirsch HH et al., 2002). Im dritten Monat p. t. wurden die 80- und 50-Perzentile aller virurischen und virämischen Patienten erreicht. Zwischen dem zweiten und fünften Jahr p. t. wurden weniger als fünf Prozent aller Fälle beobachtet.

Im Oktober 2003 traf sich ein internationales Expertenteam, bestehend aus Nephrologen, Pathologen, Virologen und Spezialisten für Infektionskrankheiten in Basel (Schweiz) um die existierenden Informationen über PAN bei Nierentransplantierten zu analysieren und evidenzbasierte Empfehlungen bezüglich Screening, Diagnostik und Management der PAN zu entwickeln.

Die Empfehlungen, die im Rahmen dieser Konsensus-Konferenz entwickelt wurden, sind im Folgenden dargestellt:

Innerhalb der ersten zwei Jahre p. t. wird empfohlen Nierentransplantat-Empfänger alle drei Monate auf BKV im Urin zu untersuchen. Dazu anerkannte Methoden sind der zytologische Nachweis von Decoy-Zellen im Urin oder die Bestimmung der BKV-DNA- oder auch BKV-VP1-mRNA-Konzentration im Urin. Zusätzlich zu den regelmäßigen Screening-Tests sollte bei Auftreten eines Funktionsverlustes des Transplantats und zum Zeitpunkt der Durchführung einer Transplantat-Biopsie eine Untersuchung auf BKV im Urin erfolgen.

Im Falle eines positiven Testergebnisses sollte zusätzlich oder erneut ein quantitativer Test erfolgen. Wird der für den jeweiligen Test festgelegte Schwellenwert (s. Abb.4) überschritten, ist eine PAN sehr wahrscheinlich und kann mittels Transplantat-Biopsie gesichert werden. Die Biopsie gibt eine zusätzliche Sicherheit, dass eine Abstoßungsneuropathie ausgeschlossen werden kann. Dieser Ausschluss und/oder der histologische Nachweis einer PAN-typischen Veränderung erlauben dann die Diagnose einer PAN und rechtfertigen eine Intervention im Sinne einer Reduktion der Immunsuppression. Die Suffizienz der Reduktion der Immunsuppression sollte alle zwei bis vier Wochen anhand sinkender Urin-DNA- bzw. -mRNA- Konzentrationen oder Plasma-DNA-Konzentrationen und durch einen fallenden Serum-Kreatinin-Spiegel überwacht werden. Beim Erreichen negativer BKV-DNA- bzw. BKV-mRNA-Messwerte in Plasma und Urin ist die PAN überstanden.

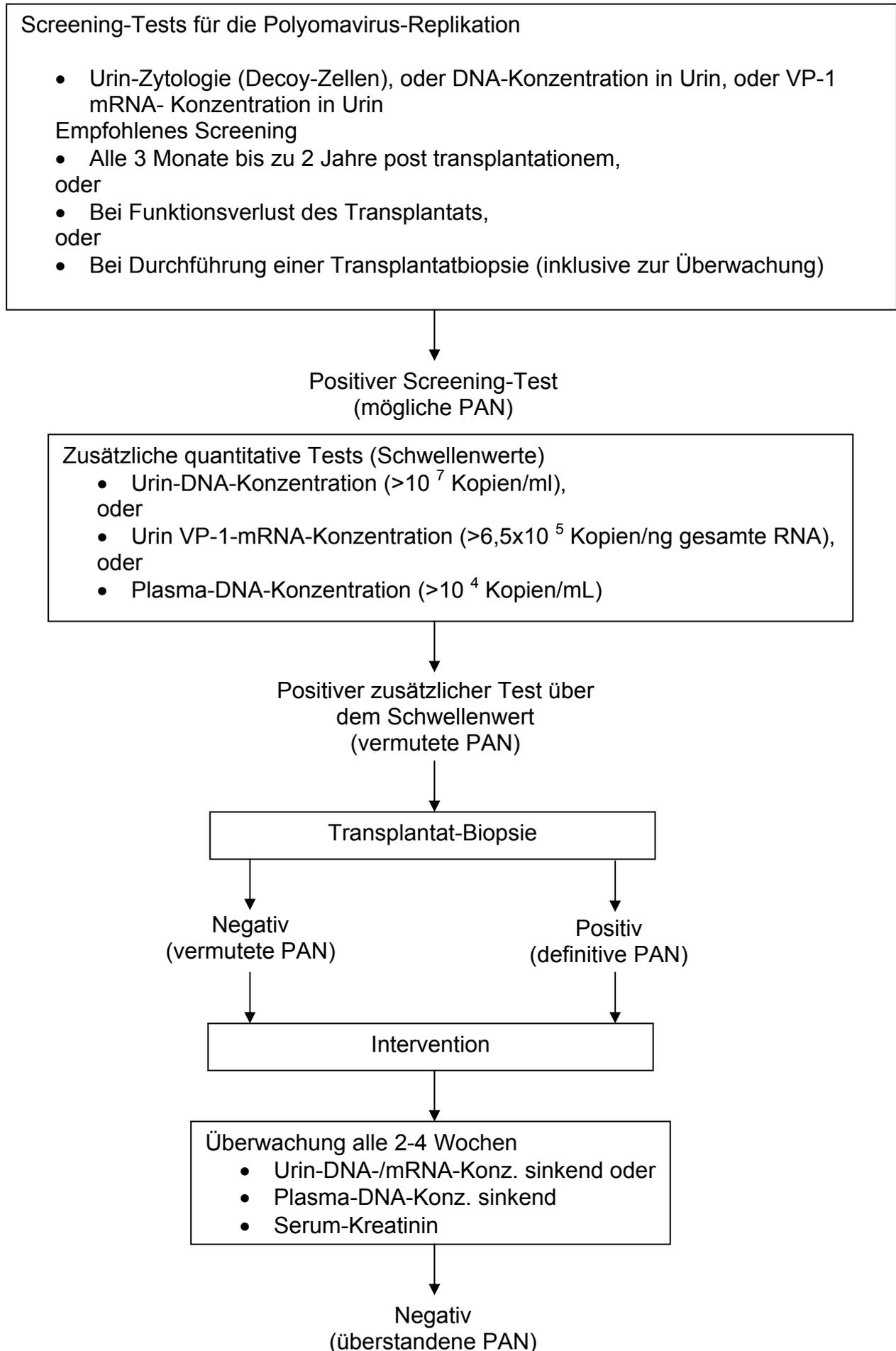


Abb.4: Screening und Monitoring der Polyomavirus-Replikation aus Hirsch HH et al., 2005, Fig.1, s. Kommentar im Text.

#### 1.2.4 Therapie

Bei JCV-assoziierten Erkrankungen ist vor allem eine Verbesserung des Immunstatus anzustreben. Es gibt derzeit keine zugelassenen antiviralen Therapeutika gegen Polyomavirusinfektionen. Einige kleinere Studien zeigen einen noch nicht gesicherten positiven Effekt von Cidofovir auf den Verlauf einer PML (Mertens T et al., 2004). Cidofovir hemmt zelluläre DNA-Polymerasen, die für die Replikation von Polyomaviren nötig sind (Mertens T et al., 2004). Ergebnisse von größeren Studien stehen noch aus. Therapieversuche mit Interferon- $\alpha$  zeigten eine leichte Verzögerung des klinischen Fortschreitens der Erkrankung (Huang SS et al., 1998). Mit dem gehäuftem Auftreten der PML bei AIDS-Patienten ergab sich die Gelegenheit, den potentiellen Effekt der hoch aktiven antiretroviralen Therapie (HAART) zu erfassen. Einige Studien berichten über eine Korrelation zwischen der HAART-Therapie und einer verlängerten Lebenszeit von ein bis zwei Jahren nach PML, einem verbesserten klinischen Status und einer Reduktion der HIV1-Konzentration im Blut (Cinque P et al., 1998 und Clifford DB et al., 1998 und Miralles P et al., 1998).

Die Behandlungsstrategien der BKV-Nephropathie befinden sich immer noch auf einer frühen Entwicklungsstufe (Fishman JA et al., 2002; Nicleleit V et al., 2000; Ramos E et al., 2002; Randhawa P et al., 1999; Randhawa P et al., 2000; Fishman JA et al., 2003; Waldman WJ et al., 1999; Poduval RD et al., 2003 und Kadambi PV et al., 2003). Bis heute gibt es keine prospektiven, randomisierten Studien zur Therapie der PAN. Somit basieren alle therapeutischen Ansätze auf möglicherweise irreführenden Beobachtungen. Eine vorsichtige Reduktion der Immunsuppression scheint die anerkannteste Handlungsoption zu sein. Allerdings muss eine zeitgleiche Abstoßung oder das Auftauchen einer akuten Abstoßung nach einer Reduktion der Immunsuppression genau beobachtet werden und die Immunsuppression, falls erforderlich, zum Teil wieder hergestellt werden.

Eine immunsuppressive Therapie, die unter diesen Umständen in Zukunft eine Rolle spielen könnte, ist eine Therapie mit Leflunomid und verwandten Substanzen, die sowohl über immunsuppressive als auch gewisse antivirale Eigenschaften verfügen (Fishman JA et al., 2003 und Waldman WJ et al., 1999). Man erhielt vielversprechende Resultate bei sechs Patienten mit PAN, als man deren

Immunsuppressivum Mycophenolat mofetil durch Leflunomid ersetzt (Poduval RD et al., 2003). Alle sechs Patienten reagierten mit sinkenden BKV-Spiegeln und einer stabilen oder verbesserten Nierenfunktion.

Das antivirale Medikament Cidofovir ist ebenfalls eine Therapieoption. Es hat jedoch eine lange Halbwertszeit, wird über die Niere ausgeschieden und ist sehr stark nephrotoxisch (Cundy KC et al., 1995). Ein Transplantatversagen wurde bereits nach ein bis zwei Dosen beobachtet (Fishman JA et al., 2003). Zwei Nierentransplantat-Empfänger wurden mit niedrig dosiertem Cidofovir behandelt, nachdem die initiale Reduktion der Immunsuppression eine zunehmende Verschlechterung der Nierenfunktion nicht verhinderte; obwohl eine Virurie bestehen blieb, verbesserte sich die Nierenfunktion und die Virämie klärte sich im Laufe von vier bis fünf Monaten (Fishman JA et al., 2003 und Kadambi PV et al., 2003)

Des Weiteren wurden Therapieversuche mit intravenösen Immunglobulinen unternommen, für die jedoch bisher der Nachweis einer Wirksamkeit fehlt (Fishman JA et al., 2002; Randhawa P et al., 2000 und Leventhal B et al., 1999).

Ramantadin wurde bei zwei Patienten mit simultaner Nieren- und Pankreastransplantation verwendet, deren Nierentransplantate aufgrund einer PAN versagten. Die Nieren wurden später, zum Zeitpunkt einer Retransplantation, entfernt; Ramantadin wurde während des Fortschreitens der PAN im ursprünglichen Transplantat ohne sichtbaren Erfolg verwendet und nach der Retransplantation fortgesetzt (Al Jedai AH et al., 2003).

### 1.3 Fragestellung

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit soll sein, eine valide Methodik zum quantitativen Nachweis humaner Polyomaviren aus Urin und Serum zu etablieren, mit der gleichzeitig eine sichere diagnostische Unterscheidung der beiden Virusspezies BKV und JCV möglich sein sollte. Diese zwar gleichzeitig amplifizierende, doch Spezies-differenzierende Nachweismethode sollte dann anhand von Probenserien immunsupprimierter NTX-Patienten überprüft und die Kinetik von Reaktivierungen entdeckt und beurteilt werden. Ein prognostischer Vergleich mit den bisher etablierten Methoden zur Beurteilung einer Polyomavirus-Reaktivierung soll erfolgen. Es soll darüber hinaus die Bedeutung eines Monitoring von NTX-Patienten mit einer solchen quantitativen und differentiellen Methodik geprüft werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Patientenurin, -plasma und -serum

Die verwendeten Urin-, und Serumproben entstammen der diagnostischen Abteilung des Instituts für medizinische Virologie der JLU-Gießen. Eingesendet wurden die Proben von der Nierentransplantationsambulanz und -station der Medizinischen Klinik II der JLU-Gießen unter der Leitung von Prof. Dr. Weimer. Die Urin- und Serumproben konnten aus den, vom Patienten für andere Untersuchungszwecke gewonnenen Proben, rekrutiert werden. Es wurden ausschließlich Proben der Patienten untersucht, die ihr schriftliches Einverständnis zur Verwendung dieser Proben für wissenschaftliche Zwecke erteilt haben. Es handelt sich hierbei um ein von der Ethikkommission des Fachbereichs Humanmedizin am Klinikum der Justus-Liebig-Universität Gießen anerkanntes Verfahren. Die Proben wurden aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 2.1.2 Oligonukleotide

Die für die real-time-PCR von uns ausgewählten Primer wurden von der Fa. MWG Biotech, Ebersberg, die HybProbes von der Fa. TibMol Biol, Berlin synthetisiert, HPLC-gereinigt und lyophilisiert geliefert. Sie werden mit DEPC-gereinigtem Wasser auf eine Konzentration von 10 pMol/ $\mu\text{l}$  eingestellt. Die HybProbes werden auf eine Konzentration von 8 pMol/ $\mu\text{l}$  verdünnt. Ihre Lagerung erfolgt unter Lichtschutz bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Primer	Sequenz	Tm [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Position
Py1-s	5'-TAGGCCYTCAATGGTTAG	59,4 $^{\circ}\text{C}$ , GC 50,0%	1298-1315
Py2-s	5'-GCCYTCAATGGTTAGRCA	55,34 $^{\circ}\text{C}$ , GC 44,4%	1301-1318
Py1-as	5'-GGTTGGGGCCATCTTC	61,6 $^{\circ}\text{C}$ , GC 62,5%	1576-1560

Y=C/T

HybProbes	Sequenz	Tm [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Position
Py-HP1-FL	5'-ATGGATGTTGCCTTTACTTCTAGGC	65,9 $^{\circ}\text{C}$ , 44 %	GC 1499-1523
Py-HP1-LR	5'-GTACGGGACTGTAACACCTGC	65,7 $^{\circ}\text{C}$ , 57 %	GC 1526-1546

FL=Fluorescein, LR=Lightcycler red

### 2.1.3 Chemikalien

Agarose-SEAKEM 1:1	FMC, Biozym, Hess. Oldendorf
Alkalische Phosphatase	Roche Diagnostics, Mannheim
Bovines Serumalbumin	New England Biolabs, Schwalbach
Reinstwasser	Reinstwasseranlage (Fa. Millipore, Eschborn) des Instituts für Medizinische Virologie
RNase-freies Wasser	Zur Herstellung des RNase-freien Wassers werden zu 100 ml Aqua bidest. 0,1% (100µl) DEPC (Pyrokohlensäurediäthylester 97%, Fa. Aldrich, Katalognummer 15,922-0/25) hinzugefügt und nach Inkubation über Nacht bei 37°C zweimalig autoklaviert. Nach Aliquotierung erfolgt die Lagerung bei -20°C.

Die Restriktionsenzyme und Puffer wurden von New England Biolabs, Schwalbach verwendet.

### 2.1.4 PCR-Reagenzien

LightCycler RNA Amplification Kit SYBR Green I	Roche Diagnostics, Mannheim Kat. Nr. 2 015 137
LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes	Roche Diagnostics, Mannheim Kat. Nr. 3 003 248
QIAquick® Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden Kat.Nr. 28706
QIAamp® Viral RNA Mini Kit	QIAGEN, Hilden Kat.Nr. 52906

Die Kits enthalten jeweils den Reaktionsmix mit PCR-Puffer und freien desoxy-Nukleotidtriphosphaten [dNTPs], die Polymerase und Magnesiumchlorid.

SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain Roche Diagnostics, Mannheim  
 Kat. Nr. 1 988 131.

Die Lösung wird 1:900 mit DEPC-Wasser verdünnt.

#### 2.1.5 Puffer

6X Agarosegel-	60 ml	Glycerin
Probenpuffer	0,1 g	Bromphenolblau
	ad 100 ml	TE-Puffer pH 8,0

TAE-Puffer	40 mM	Tris-Acetat
	1 mM	EDTA pH 8,0

TE-Puffer	10 mM	Tris-HCL pH 8,0
	1 mM	EDTA, pH 8,0

#### 2.1.6 Längenstandard

*pUC-Mix Marker 8:*

(Fa. MBI Fermentas, St. Leon-Rot) mit den Fragmentgrößen (in bp):

1114, 900, 692, 501/489, 404, 320, 242, 190, 147, 124, 110, 67, 37/34/26/19

#### 2.1.7 Plasmid

JCV- und BKV- Gesamtgenome kloniert in pBluescript	Dankbarerweise von Prof. K. Dörries, Institut für Virologie der bayerischen Julius-Maximilians- Universität Würzburg
--	--

#### 2.1.8 Geräte

Agarosegel-Elektrophoresekammern	Werkstatt des Institutes
Elektronenmikroskop EM 10 CR	Zeiss, Oberkochen
Gelkamera CS1, Thermodrucker, Monitor	Cybertech, Berlin
Light-Cycler	Roche Diagnostics, Mannheim
Spannungsgerät Feathervolt	Stratagene, Heidelberg

Spectrophotometer-Dual DU 70	Beckman, München
Transilluminator (UV)	Cybertech, Berlin
Zentrifuge Biofuge 1512	Heraeus, Osterode/Harz
Zentrifuge Eppendorf 5417C	Eppendorf, Hamburg

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Extraktion viraler Nukleinsäuren

Zur Extraktion der viralen DNA aus Serum und Urin wurde das Viral RNA Mini Kit (Kat.-Nr. 52906) der Firma Qiagen verwendet. Das QIAamp RNA Mini Kit zeigte sich im Vergleich zum QIAamp DNA Mini Kit nach Angaben der Hersteller als besser geeignet, um die virale DNA aus Urin zu isolieren. Der im QIAamp Viral RNA Mini Kit zur Lyse der viralen Partikel verwendete AVL-Puffer inaktiviert die zahlreichen im Urin vorhandenen PCR-Inhibitoren.

Die Methode beruht auf der selektiven Affinität von Nukleinsäuren zu einer Silikamatrix in Gegenwart von hohen Salzkonzentrationen. Das vom Hersteller empfohlene QIAamp Viral RNA Mini Spin Protocol wurde in modifizierter Form angewandt. Vor dem Auswaschen der Nukleinsäuren erfolgte eine zusätzliche Zentrifugation ohne Waschlösung, um den Alkohol sicher aus der Matrix zu entfernen. Die Elution erfolgte nicht mit dem beigelegten Puffer, der die LC-PCR inhibieren kann, sondern mit DEPC-Wasser, welches keine weiteren Salze in den Messansatz des Lightcyclers einbringt.

### 2.2.2 Quantifizierung viraler Nukleinsäure mittels real-time PCR

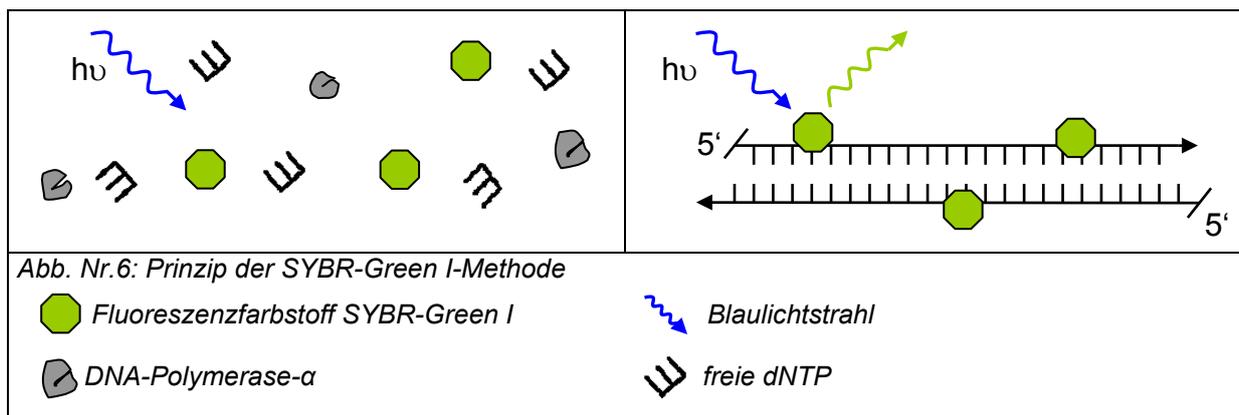
Die Quantifizierung viraler Nukleinsäuren erfolgte mittels LightCycler-PCR. Die Besonderheit dieser PCR-Methode liegt einerseits in der kurzen Zyklusdauer dank der hohen Temperaturübertragungsraten von bis zu 20 °C pro Sekunde, andererseits in der Möglichkeit die Amplifikation des PCR-Produkts simultan und kontinuierlich zu beobachten. Dies geschieht mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen, deren Signalintensitäten in Relation zur Menge des PCR-Produkts stehen. Das LC-System misst die Fluoreszenz typischerweise einmal pro Zyklus, um den Zuwachs des PCR-Produkts festzustellen. Eine im Anschluss an die PCR durchgeführte Schmelzkurvenanalyse erhöht die Spezifität des Verfahrens. Jede dsDNA-Struktur besitzt eine spezifische Schmelztemperatur. Dadurch ist es möglich die amplifizierte

Zielsequenz von unerwünschten Nebenprodukten zu unterscheiden und bei der Verwendung von HybProbes sogar Mutationen und verschiedene Genotypen zu erkennen.

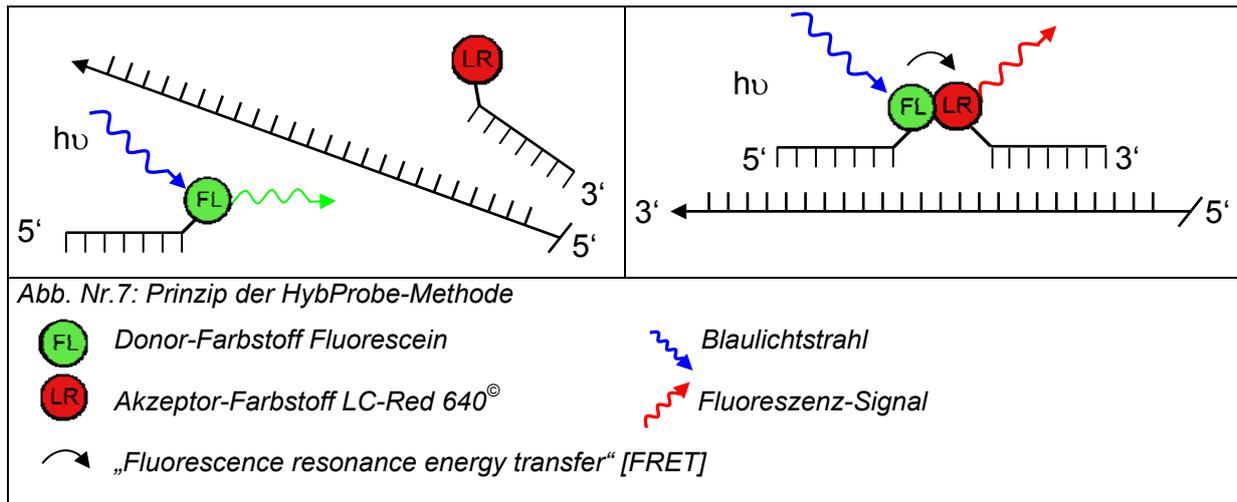
Vorteil der Methode ist, dass sowohl die Amplifikation als auch die Schmelzkurvenanalyse in derselben geschlossenen Kapillare durchgeführt werden und somit die Kontaminationsgefahr gering bleibt.

Zur kontinuierlichen Messung der Amplifikation kamen zwei verschiedene Fluoreszenzformate zum Einsatz, das sequenzunabhängige SYBR-Green I-Format (s. Abb.6) und ein sequenzspezifisches Format mit, an Fluorophore gebundenen, Hybridisierungssonden (s. Abb.7).

Bei beiden Meßmethoden werden die Fluorophore durch einen Blaulichtstrahl von 470 nm Wellenlänge angeregt. Das ausgesendete Fluoreszenzsignal wird in die optische Einheit des LC-Gerätes zurückgeleitet und je nach Wellenlänge von einem der drei zu Verfügung stehenden Kanäle erkannt.



Bei der SYBR-Green-Methode lagert sich der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green 1 in die Doppelstrangstruktur des Amplifikats ein. Am Ende der Elongationsphase liegt die DNA doppelsträngig vor und eine maximale Menge an Farbstoff wird gebunden, so dass zu diesem Zeitpunkt die Intensität des Fluoreszenzsignals als Maß der DNA-Menge verwendet werden kann. Die Fluoreszenz wird bei 530 nm in Kanal 1 des LC-Systems gemessen. Die Zunahme des PCR-Produkts kann so Zyklus für Zyklus beobachtet werden.



Die Hyb-Probe-Methode basiert auf einem distanzabhängigen Energietransfer zwischen benachbarten Fluorophoren, dem so genannten „Fluorescence resonance energy transfer“ [FRET] (s.Abb.7). Hierbei werden zwei mit Farbstoffen versehene, hochspezifische Hybridisierungssonden verwendet, die sich während des Annealing-Schrittes der PCR an die einsträngige Ziel-DNA anlagern. Der Donor-Farbstoff Fluorescein ist kovalent an das 3'-Ende der einen, der Akzeptor-Farbstoff LC-Red 640<sup>®</sup> an das 5'-Ende der anderen Oligonukleotidsonde gebunden. Um zu verhindern, dass die Akzeptorsonde als Primer wirken kann, ist sie an ihrem 3'-Ende phosphoryliert. Die Basensequenzen der beiden Sonden werden so ausgewählt, dass sie am DNA-Fragment der Zielsequenz in einer Kopf-zu-Schwanz-Anordnung mit 1-5 Nukleotiden Abstand hybridisieren.

Wird der Donor-Farbstoff (Fluorescein) durch die Blaulichtquelle angeregt und befinden sich die beiden Farbstoffe in unmittelbarer Nähe, überträgt dieser die Energie an den Akzeptor-Farbstoff (LC-Red 640<sup>®</sup>), welcher dann Fluoreszenzlicht einer anderen Wellenlänge abgibt. Die Wellenlänge des abgestrahlten Lichtes ist abhängig vom verwendeten LC-Red : LC-Red 640<sup>®</sup> (640 nm) wird in Kanal 2, LC-Red 705<sup>®</sup> (705 nm) in Kanal 3 der optischen Einheit des LCs, am Ende eines jeden Annealing-Schrittes, gemessen. Dadurch ist es möglich, in einem Ansatz HybProbes unterschiedlicher Spezifität zur Detektion verschiedener Genotypen einzusetzen.

Im Reaktionsprofil einer PCR, in dem die gemessenen Fluoreszenzen gegen die Anzahl der verstrichenen Zyklen grafisch dargestellt werden, können drei Abschnitte unterschieden werden: zu Beginn ist in allen Proben gleichermaßen eine

Grundfluoreszenz vorhanden, man spricht von einer frühen Hintergrundphase. Dieser Phase schließt sich die sog. exponentielle Wachstumsphase an. Sie beginnt, wenn genügend Zielsequenz amplifiziert wurde um von der Grundfluoreszenz abgegrenzt werden zu können. Die Zykluszahl bei der das Fluoreszenzsignal einer Reaktion erstmalig über die Grundfluoreszenz hinaus ansteigt, um dann exponentiell an Intensität zuzunehmen, ist abhängig von der Ausgangskonzentration der Zielsequenz. In späteren Zyklen geht die exponentielle Wachstumsphase in die Plateauphase über. Für die sinkende Reaktionseffizienz gibt es verschiedene Gründe: die freien desoxy-Nukleotidtriphosphate [dNTP] nehmen in ihrer Konzentration ab; die Enzymaktivität sinkt durch das Erhitzen; das Re-annealing des PCR-Produkts hemmt zunehmend die Hybridisierung der Primer; zudem inhibieren entstandene Nebenprodukte die Reaktion (Meuer S et al., 2001, S. 21ff.).

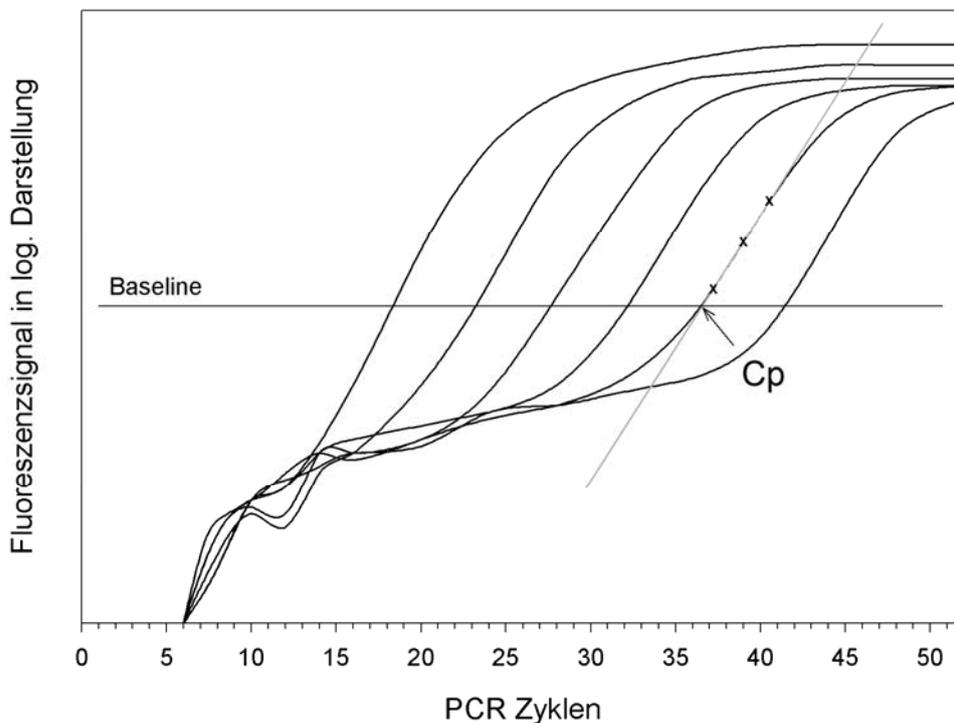


Abb.8: Schematische Darstellung eines LightCycler-Laufes für Proben mit unterschiedlichem Anfangsgehalt an DNA (Jonas T, 2004)

Um nun die initiale Probenkonzentration mit der real-time Fluoreszenzkurve exakt zu korrelieren, ist es notwendig eine Zykluszahl zu ermitteln, welche die Position der Kurve definiert (Meuer S et al., 2001). Eine solche virtuelle Zykluszahl (Crossing point) lässt sich mit Hilfe der „second derivative maximum“-Methode objektiv und mit hoher Reproduzierbarkeit bestimmen. Als Crossing point [Cp] dient hierbei der erste

Wendepunkt der Fluoreszenzkurve, der durch einen Algorithmus der LC-Software identifiziert wird (s. Abb.8). Bei einer mathematischen Kurvendiskussion entspricht dieser Wendepunkt dem ersten Höhepunkt der zweiten Ableitung, wodurch sich der Name der Methode erklärt (LightCycler Operator's Manual Version 3.5, 1999).

Die Zuordnung der Cps zu den entsprechenden Probenkonzentrationen erfolgt mittels einer externen Standardkurve (s. Abb.11).

### 2.2.3 Differenzierung viraler Nukleinsäure mittels Schmelzkurvenanalyse

Im Anschluss an die Quantifizierung folgt die Schmelzkurvenanalyse- eine Funktion des LC-Systems, die sowohl der Spezifitätsprüfung als auch der Detektion von Sequenzvarianten dient (s. Abb.10). Hierzu wird die Temperatur in 0,1 °C-Schritten erhöht und kontinuierlich die Temperatur gemessen. Dadurch ist es möglich, das Schmelzverhalten der amplifizierten Nukleinsäuren sehr genau zu beobachten. Sobald die dsDNA zu denaturieren beginnt, löst sich der SYBR-Green-Farbstoff. Dies führt zu einem Absinken des Fluoreszenzsignals. Bei der HybProbe-Methode denaturieren mit steigender Temperatur die HybProbe-Amplifikat-Doppelstränge, wodurch die Fluorophore voneinander getrennt werden und der FRET auf Grundfluoreszenzniveau sinkt (Meuer S et al., 2001, S. 11ff.). Jedes dsDNA-Produkt hat seine eigene spezifische Schmelztemperatur [ $T_m$ ]. Die Schmelztemperatur ist die Temperatur bei der 50% der Zielsequenz in Einzelsträngen vorliegen. In einer Schmelzkurve, in der die erste negative Ableitung der Fluoreszenz ( $-dF/dT$ ) gegen die Temperatur aufgetragen wird, entspricht der Höhepunkt der Kurve der Schmelztemperatur.

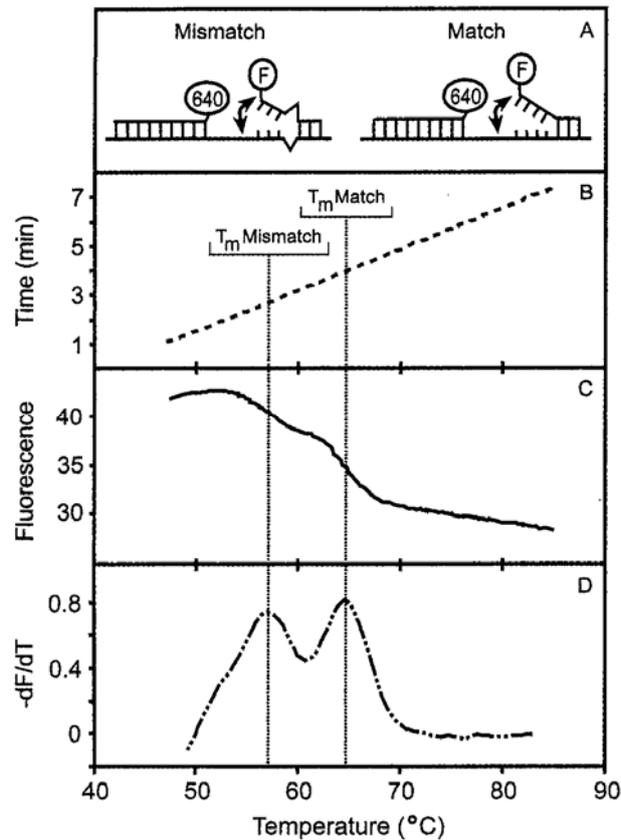


Abb.9: Schematische Darstellung einer Fluoreszenz-Schmelzkurve zur Genotypisierung. A zeigt das Gleichgewicht zwischen einzel- und doppelsträngiger DNA bei der jeweiligen Schmelztemperatur der dsDNA-Produkte mit und ohne Basenfehlpaarung. B zeigt die verstrichene Zeit vs. Proben temperatur während der Schmelzphase der Reaktion. Der Wendepunkt des Schaubildes C, Fluoreszenz vs Temperatur, identifiziert die Temperatur, bei welcher 50% der Fluorescein-Proben geschmolzen sind ( $T_m$ ). Zur besseren Darstellung der Schmelztemperaturen dient Schaubild D, welches eine Ableitung der Schmelzkurve darstellt, in welcher der Höhepunkt der Kurve dem Wendepunkt aus Schaubild C entspricht. Die Ordinate von D ist die negative Ableitung der Fluoreszenz bezogen auf die Temperatur, bzw.  $-dF/dT$  (aus: Meurer S et al., 2001, S. 13 Fig.2).

Die Wärmestabilität der dsDNA (SYBR-Green) bzw. des HybProbe-Zielsequenz-Doppelstrangs ist beispielsweise abhängig von Faktoren wie Länge, G:C-Gehalt, Sequenzabfolge und Watson-Crick-Paarung (Wetmur JG, 1995 und Santa Lucia J et al., 1996). Während bei der SYBR-Green-Methode lediglich eine Aussage über die Länge des gebildeten Amplifikates bzw. entstandener Nebenprodukte möglich ist, können HybProbes aufgrund ihrer sequenzspezifischen Bindung in Kombination mit der Schmelzkurvenanalyse zur Detektion einzelner Basen-Fehlpaarungen verwendet werden. Basen-Fehlpaarungen verändern die Stabilität eines Doppelstranges, wodurch die  $T_m$  der HybProbe, in Abhängigkeit von der vorliegenden Fehlpaarung,

der Position der Fehlpaarung und benachbarter Basenpaare, sinkt (Allawi et al., 1997, 1998 und Guo Z et al., 1997 und Peyret N et al., 1999). Von G:C-Paaren flankierte Fehlpaarungen sind beispielsweise stabiler als solche, die von A:T-Paaren umgeben sind. Fehlpaarungen, die mehr im Zentrum der HybProbe gelegen sind wirken destabilisierender als Fehlpaarungen nahe den HybProbe-Enden (Meuer S et al., 2001, S. 11ff.). Die  $T_m$ -Differenz, die durch eine Fehlpaarung bewirkt wird, beträgt normalerweise zwischen 5°C im Falle der Purine und 9°C bei den Pyrimidinen und ist dadurch gut zu erkennen (Meuer S et al., 2001, S. 35ff.).

Um mit HybProbes erfolgreich eine Quantifizierung und Sequenzanalyse durchführen zu können, müssen bei deren Auswahl einige wichtige Kriterien berücksichtigt werden:

Zunächst muss die so genannte Sensor-HybProbe so ausgewählt werden, dass sie mit der zu analysierenden DNA-Sequenz hybridisiert. Dabei sollte die Zielsequenz eine möglichst ausgewogene Verteilung aller vier Basen beinhalten. Eine Aneinanderreihung der gleichen Base oder einfache repetitive Sequenzen sind zu vermeiden, da sonst die Gefahr besteht, dass die HybProbe auf ihrer Zielsequenz verrutscht und an anderer Stelle bindet. Ebenfalls ungünstig sind G:C-reiche Sequenzen, da sie zu sehr starken Bindungen führen und auch unerwünschte Fehlbindungen provozieren können. Palindrome und Komplementarität innerhalb einer HybProbe können zu Probe-Probe-Dimeren oder Schleifenbildung führen. Dadurch sinken die Konzentrationen an „freien“ HybProbes und verfügbarer einzelsträngiger Zielsequenz. Die beiden HybProbes sollten auch untereinander nicht komplementär sein, da es sonst, unabhängig von der Anwesenheit des PCR-Produkts, zu einem FRET kommen kann. Die Komplementarität zwischen den 3'-Enden der Primer und den HybProbes sind aufgrund der potentiellen Dimer-Bildung ebenfalls zu vermeiden.

Die HybProbes sollten möglichst weit vom Primer desselben Stranges entfernt liegen, denn sobald der Primer durch die Polymerase verlängert wird, ist ein Hybridisieren der HybProbes mit der Zielsequenz nicht mehr möglich. Da das Fluoreszenzsignal während des Annealings der PCR gemessen wird, sollte die  $T_m$  der HybProbes höher sein als die Annealingtemperatur. Um jedoch die Verlängerung der Primer nicht zu blockieren, darf die  $T_m$  der HybProbes auch nicht viel höher sein als die Extensionstemperatur.

#### 2.2.4 Praktische Durchführung der LC-PCR

Die für die Messungen verwendeten Serum- und Urinproben werden alle nach dem gleichen modifizierten QIAamp Viral RNA Mini Spin-Protokoll extrahiert. Für ein Eluat von 60 µl werden 140 µl Probe eingesetzt. 5 µl des Proben-Extrakts werden mit 15 µl Mastermix (Zusammensetzung s.u.) in eine LC-Kapillare pipettiert und diese bei 1500 U/Min 30 sec. zentrifugiert. Im Anschluss werden die maximal 31 Kapillaren in das LC-Karussell eingesetzt.

Bei jedem PCR-Lauf wird ein Standard und eine Negativkontrolle mitgeführt. Als Negativkontrolle diente RNase-freies Wasser. Zur Herstellung eines Standards wurde ein Plasmid linearisiert, dessen Molarität bestimmt und anschließend eine Verdünnungsreihe hergestellt (s. Abb.11). Verdünnungsreihen des Standards ergeben eine Steigung der Eichgeraden (Slope) von 3,1-3,4, was einer optimalen Effizienz entspricht (LC Operator's Manual Version 3.5, 1999). Bei dieser Effizienz ergab sich bei einem Cp von 24 eine Konzentration von  $1 \cdot 10^6$  Ge/ml.

Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass sowohl Primer als auch HybProbes bevorzugt an ihre Zielsequenzen binden und somit die Amplifikation unspezifischer DNA-Sequenzen gering zu halten, erfolgt die Amplifikation im Sinne einer Touchdown-PCR. Das bedeutet, dass die Annealing-Temperatur, bei 64°C in Zyklus 1 beginnend, mit jedem weiteren Zyklus um 1°C gesenkt wird bis sie eine Temperatur von 52 °C erreicht hat. Insgesamt werden 45 Amplifikationszyklen durchlaufen. Der Elongationsschritt erfolgt bei 72°C, wobei die sonst übliche Temperaturübertragungsrate von 20°C/sec. auf 5°C/sec. reduziert wird. Der Grund ist eine bessere Effektivität der Polymerase bei niedrigen Heizgeschwindigkeiten.

Die Fluoreszenzmessung erfolgt bei der SYBR-Green-Methode etwa 1°C unterhalb der Schmelztemperatur des Amplifikates, bei der HybProbe-Methode im niedrigsten Schmelzpunkt der beiden Sonden.

Im Anschluss an die Amplifikation folgt die Schmelzkurvenanalyse. Die Proben werden in 0,1°C-Schritten von 50 auf 90°C erhitzt, die Fluoreszenz wird dabei kontinuierlich gemessen.

Nachdem die Spezifität der Amplifikate, bei Etablierung der Methode, mittels Gel-Elektrophorese und Sequenzierung sichergestellt werden konnte, erfolgte jede weitere Spezifitätsprüfung mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse.

Um den Spezifitätsgewinn der HybProbe-Methode gegenüber der SYBR-Green-Methode darzustellen, konnte das bereits etablierte SYBR-Green-Protokoll für Simian Virus 40 (SV40) verwendet werden.

#### 2.2.4.1 Real-time PCR von BKV- und JCV-DNA

Mastermix je Probe	Endkonzentration
6,1 µl Wasser	
2,4 µl 25 mM MgCl <sub>2</sub>	6 mM
2,0 µl 10 mM Primer Py1-as	100 pM
1,0 µl 10 mM Primer Py1-s	50 pM
1,0 µl 8 mM HybProbe Py-HP2-LR	40 pM
0,5 µl 8 mM HybProbe Py-HP1-FL	20 pM
2,0 µl Fast Start Reaktionsmix (enthält 6 mM MgCl <sub>2</sub> )	

entspricht 15 µl/Ansatz, dazu 5 µl DNA-Extrakt  
PCR-Reagenzien aus dem RNA HybProbe Kit der Fa. Roche.

Als Standard dienten drei verschiedene Patientenerine.

Abschnitt	Zyklen		Temperatur [°C]	Dauer [sec]	Slope (°C/sec)
Denaturierung	1		95	600	20
Amplifikation	45	Denaturierung	95	9	20
		Annealing	64-52	8	20
		Fluoreszenzmessung	step size 1		
		Elongation	72	13	5
Schmelzkurve	1	Denaturierung	95	10	20
		Annealing	50	15	20
		Melting	50-95	0	0,1
Kühlen	1		40	30	20

#### 2.2.4.2 Real-time PCR von SV 40-DNA

Mastermix je Probe	Endkonzentration
2,2 µl Wasser	
2,4 µl 25 mM MgCl <sub>2</sub>	6 mM
1,0 µl 10 mM Primer Py1-s	50 pM
2,0 µl 10 mM Primer Py1-a	100 pM
0,4 µl SYBR-Green (1:900)	
2,0 µl Fast Start Reaktionsmix (enthält 6 mM MgCl <sub>2</sub> )	

entspricht 10 µl/Ansatz, dazu 10 µl DNA-Extrakt.

Abschnitt	Zyklen		Temperatur [°C]	Dauer [sec]	Slope (°C/sec)
Denaturierung	1		95	600	20
Amplifikation	42	Denaturierung	95	5	20
		Annealing	64-52	11	20
		Fluoreszenzmessung	step size 1		
		Elongation	72	13	5
Schmelzkurve	1	Denaturierung	95	10	20
		Annealing	67	15	20
		Melting	50-95	0	0,1
Kühlen	1		40	30	20

### 2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese und Sequenzierung

Die Auftrennung und Identifikation von DNA-Fragmenten erfolgte mit der Methode der Agarose-Gelelektrophorese. Anhand der Wanderungsgeschwindigkeit eines DNA-Fragments lässt sich mit einer Standardagarose dessen Länge im Bereich von 0,2 bis 25kb näherungsweise bestimmen.

In Abhängigkeit von den erwarteten Fragmentlängen der zu trennenden DNA-Fragmente wurden Agarosekonzentrationen von 0,8 – 2% verwendet. Hierzu wurde die vorgesehene Agarosemenge in 1x TAE-Puffer durch Erhitzen in einem Mikrowellengerät vollständig gelöst; Verdampfungsverluste wurden mit ddH<sub>2</sub>O ausgeglichen. Die für den jeweiligen Gelschlitten erforderliche Menge der geschmolzenen Agarose wurde mit 1µl Ethidiumbromid-Stammlösung (10mg/ml aq.) versetzt. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und dient dazu, die DNA im Agarosegel sichtbar zu machen.

Der mit einem Teflonkamm zur Taschenbildung versehene Gelschlitten wurde mit der Agarose begossen und nach dem Erkalten bei Rt in eine Elektrophoresekammer gegeben. Da DNA-Lösungen und der Elektrophoresepuffer in etwa die gleiche Dichte besitzen, wurden alle Proben sowie der DNA-Längenstandard mit 1/6 Volumen 6x Ladepuffer versetzt, um so deren Dichte zu erhöhen und das Einfüllen der Lösungen in die Geltaschen zu ermöglichen. Der dem Probenpuffer zugefügte Farbstoff Bromphenolblau diente der Orientierung über den Verbleib der DNA während des Auftrags und des Gellaufs, er migriert im Agarosegel wie DNA-Fragmente von etwa 300 bp Länge. Der Gelelektrophoreselauf erfolgte bei einer Spannung von 90 – 110 Volt.

Zum Nachweis der DNA wurde das Gel auf einem UV-Illuminator bei 302 nm betrachtet. Ethidiumbromid gibt aufgrund seiner fluoreszierenden Eigenschaften sichtbares Licht zwischen 500 und 590 nm ab, das mit Hilfe einer digitalen Gelkamera und einem angeschlossenen Thermodrucker dokumentiert werden konnte.

Zur Sequenzierung wurden die Amplifikate aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem QIA- Gel-Extraktions-Kit extrahiert. Die Sequenzierung selbst erfolgte durch die Fa. MWG Biotech, Ebersberg.

#### 2.2.6 Restriktionsverdau zur Linearisierung von Polyomaplasmiden

Für den Restriktionsverdau wurde das BK-Virus-Plasmid mit dem Restriktionsenzym BamH1 und dem Puffer BamH1 über Nacht bei 37°C inkubiert. Dann wurden dem Verdau alkalische Phosphatasen hinzugefügt, um ein Wiederverbinden der DNA-Enden zu vermeiden. Die Plasmid-Fragmente wurden mit Hilfe eines Agarosegels aufgetrennt und gereinigt.

#### 2.2.7 Elution aus Agarosegelen

Um einheitliche DNA-Fragmente zur Klonierung zu erhalten, wurden die gewünschten Stücke unter UV-Licht bei 366nm aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Anschließend erfolgte eine Aufspaltung der Agarose mittels Natriumjodid und eine Reinigung durch das Prinzip der selektiven Affinität von DNA zu Glasmilch bzw. Silicamatrix in Gegenwart chaotroper Salze.

Hierzu wurde das System NUCLEOTRAP™ der Fa. Macherey-Nagel Kat.-Nr. 740584 nach den Angaben des Herstellers verwendet.

### 3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Patienten der Nierentransplantationsstation der Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Giessen nach ihrer Transplantation auf die BK- und JC-Viruskonzentration in Urin und Serum untersucht. Um einen quantitativen Nachweis der JCV- und BKV-DNA zu erbringen wurde zunächst eine differentielle real-time PCR etabliert. Primer und Hybprobes wurden dabei so ausgewählt, dass sowohl BKV- als auch JCV-DNA in einem einzigen PCR-Ansatz quantitativ bestimmt und durch Schmelzkurvenanalytik gleichzeitig differenziert werden können.

#### 3.1 Etablierung der differentiellen real-time PCR

##### 3.1.1 Primer-Probe-Sets, Urinproben mit oder ohne EDTA

Für unsere PCR-Methode wählten wir nach ausgiebigen Sequenzvergleichen (s. Kapitel 3.1.5.2) Primer aus, die ausschließlich an konservierte Gensequenzen der BKV-, JCV- und SV40-DNA binden, sowie HybProbes, deren Zielsequenzen nur im BKV- und JCV-Genom vorkommen. Zudem verfügen die ausgewählten Primer und HybProbes über eine erforderliche  $T_m$ -Differenz von etwa 5°C (s. Kapitel 2.1.2).

Zu Beginn erfolgten Versuche in denen zwei BK-sense-Primer (Py1-s und Py2-s), die den genannten Anforderungen entsprachen, miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass Primer Py1-s eine effektivere PCR ermöglicht. Da bei den Versuchen sowohl Serumproben als auch Urinproben mit und ohne EDTA eingesetzt wurden, konnte zusätzlich der deutliche Vorteil des mit EDTA versetzten Urins gegenüber dem reinen Urin gezeigt werden. In allen weiteren Versuchen wurden die Urinproben vor Extraktion mit EDTA versetzt und die PCR mit dem BK-sense-Primer Py1-s durchgeführt.

##### 3.1.2 Optimierung der PCR-Bedingungen

Zur Optimierung der Magnesiumkonzentration im BK-Mastermix wurde eine Magnesiumtitrationsreihe durchgeführt. Hierzu wurde eine Reihe von HybProbe-Assays mit folgender Zusammensetzung angesetzt:

Primer Py1-s: 1µl

Primer Py1-as: 2µl

HybProbe Py-HP1-FL: 0,5µl  
 HybProbe Py-HP1-LR: 1µl  
 Faststart: 2µl.

Den Ansätzen wurden aufsteigende Mengen an  $MgCl_2$  und entsprechende Mengen Wasser hinzugefügt, so dass das Gesamtvolumen des Mastermixes 15µl betrug. Zu jedem Mastermix kamen 5µl Template. Die getesteten Magnesiumkonzentrationen betragen 3mM, 4mM, 5mM, 5,5mM, 6mM, 6,5mM, 7mM, 7,5mM, 8mM und 8,5mM.

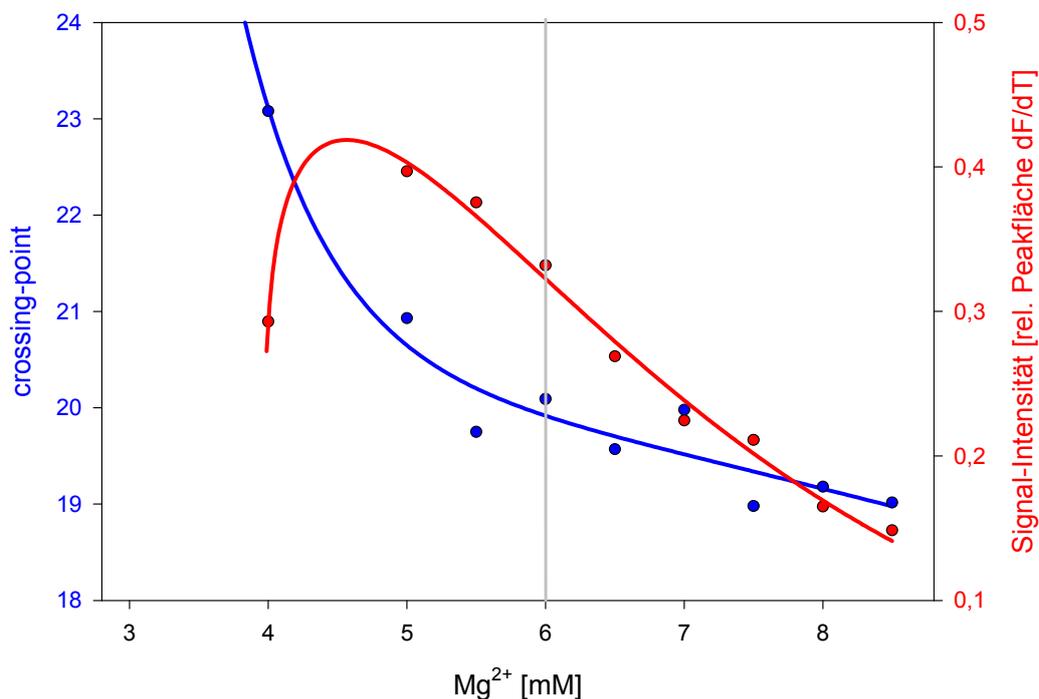


Abb.10: Abhängigkeit der Signalintensität und des Crossing-points von der Magnesiumkonzentration.

Zur Auswahl der optimalen Magnesiumkonzentration wurden die Ergebnisse der Amplifikation zum einen nach den Crossing-Points und zum anderen nach der Signalstärke in Abhängigkeit von der Magnesiumkonzentration in ein Diagramm (s. Abb.11) eingetragen. Es galt nun einen Kompromiss zu finden zwischen noch ausreichender Signalstärke (>0,3 Peakflächen) bei niedrigstem Crossing-Point. Wir entschieden uns daher für eine  $MgCl_2$ -Menge von 6mM pro BKV-Mastermix.

### 3.1.3 Kalibrierung/Sensitivität

Zur ersten Kalibrierung wurde ein Plasmid verwendet, in das das Genom des BK-Virus in voller Länge einkloniert war (überlassen von Frau Prof. K. Dörries, Regensburg). Aus der linearisierten Plasmid-DNA, deren molare Konzentration photometrisch und mit Hilfe von Agarose-Gelelektrophorese bestimmt worden ist, wurde eine Verdünnungsreihe zur Kalibrierung hergestellt. Zur Erstellung einer externen Standardkurve wurden die durch LC-PCR ermittelten Cps der Verdünnungsreihe in halblogarithmischer Darstellung gegen die jeweiligen Plasmid-DNA-Konzentrationen aufgetragen. Eine Regressionsgerade durch die Datenpunkte erlaubt es, die Ausgangskonzentration einer jeden Probe anhand ihres Cps abzulesen (s. Abb.9). Die Konzentration wird üblicherweise in Genomen pro mL angegeben. Die Nachweisgrenze unserer LC-PCR-Methode liegt nach der Auswertung von etwa 1200 Messungen bei 10 Genomen/ml und verfügt über einen linearen Messbereich von  $10\text{-}10^{10}$  Genomen/ml.

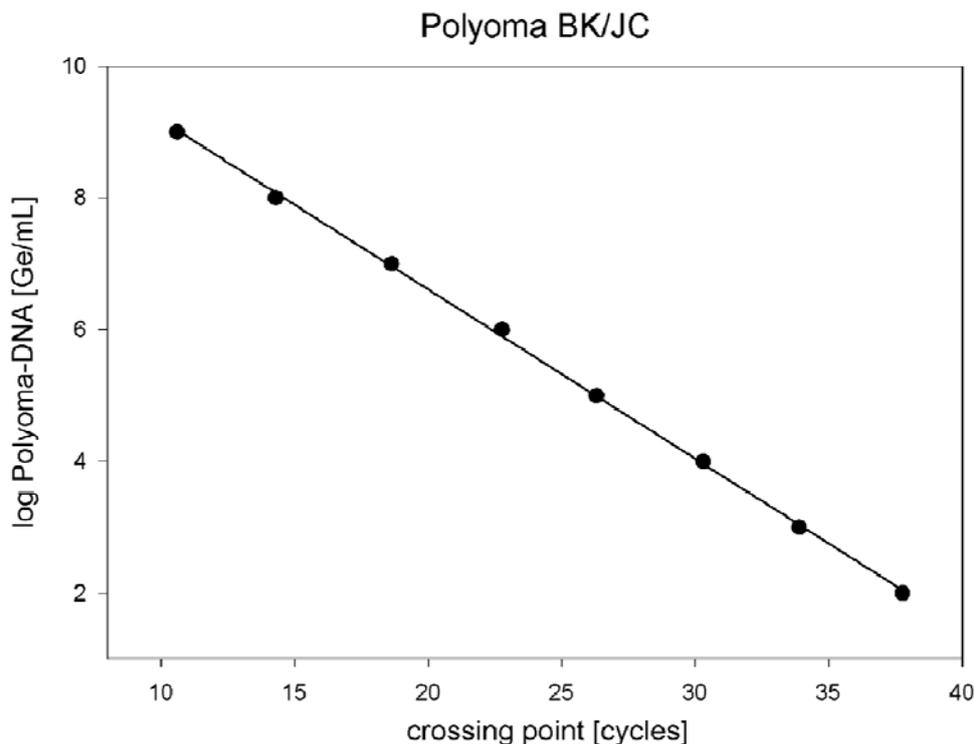


Abb.11: Ermittelte Regressionsgerade durch die Crossing Points des Standards zur Ermittlung unbekannter Ausgangskonzentrationen.

### 3.1.4 Intertestgenauigkeit

Zur Bestimmung der Intertestgenauigkeit wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen dreier verwendeter Standardverdünnungen berechnet (s. Abb. 12). Eine bei Nukleinsäure-Quantifizierungsverfahren tolerierte Standardabweichung von 0,5 log-Stufen wurde bei keinem der verwendeten Standards überschritten.

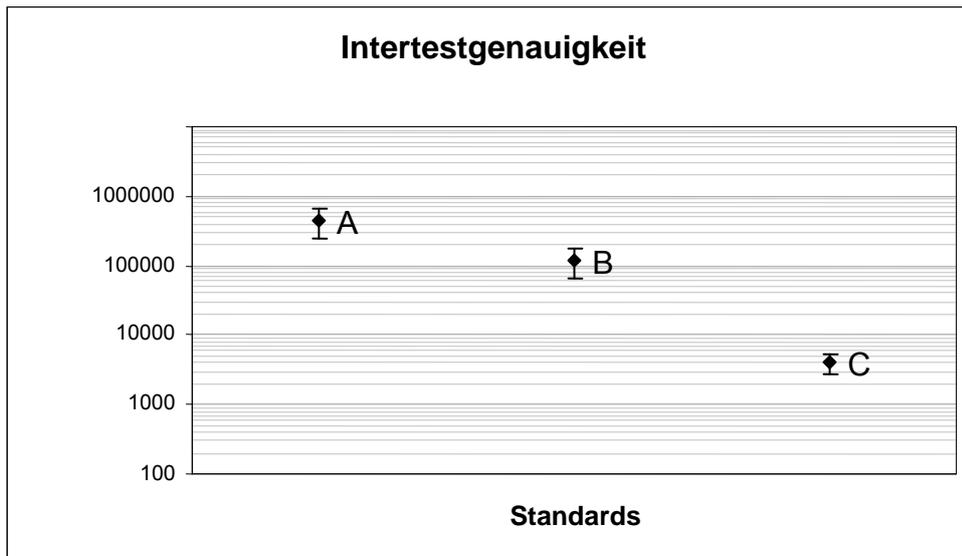


Abb. Nr.12: Intertestgenauigkeit von den verschiedenen Standardverdünnungen (Sekundärstandard aus BKV-positivem Urin). Standard A 31 Läufe (SD 47,1%), Standard B 24 Läufe (SD 44,3%), Standard C 18 Läufe (SD 32%).

### 3.1.5 Spezifitätskontrolle

#### 3.1.5.1 Schmelzkurvenanalyse

Die Spezifität der JCV- und BKV-DNA-Amplifikation wurde mittels unterschiedlicher Methoden überprüft. Eine Methode stellt die, im Anschluss an die Quantifizierung durchgeführte, Schmelzkurvenanalyse dar. Denn jedes dsDNA-Produkt hat seine eigene spezifische Schmelztemperatur [ $T_m$ ].

Die Zielsequenzen der HybProbes wurden für die PCR so ausgewählt, dass sich die Zielsequenzen der Sensor-HybProbe im JC- und BK-Genom in zwei Basen unterscheiden. Dadurch kommt es bei der Hybridisierung der Sensor-HybProbe mit dem JC-Genom zu Fehlpaarungen im Bereich dieser beiden Basenpaare (s. Abb. 16). Die  $T_m$  des JC-ds-DNA-Produkts liegt daher theoretisch um 10°C (zwei Pyrimidinaustausche) unter der des BK-ds-DNA-Produkts.

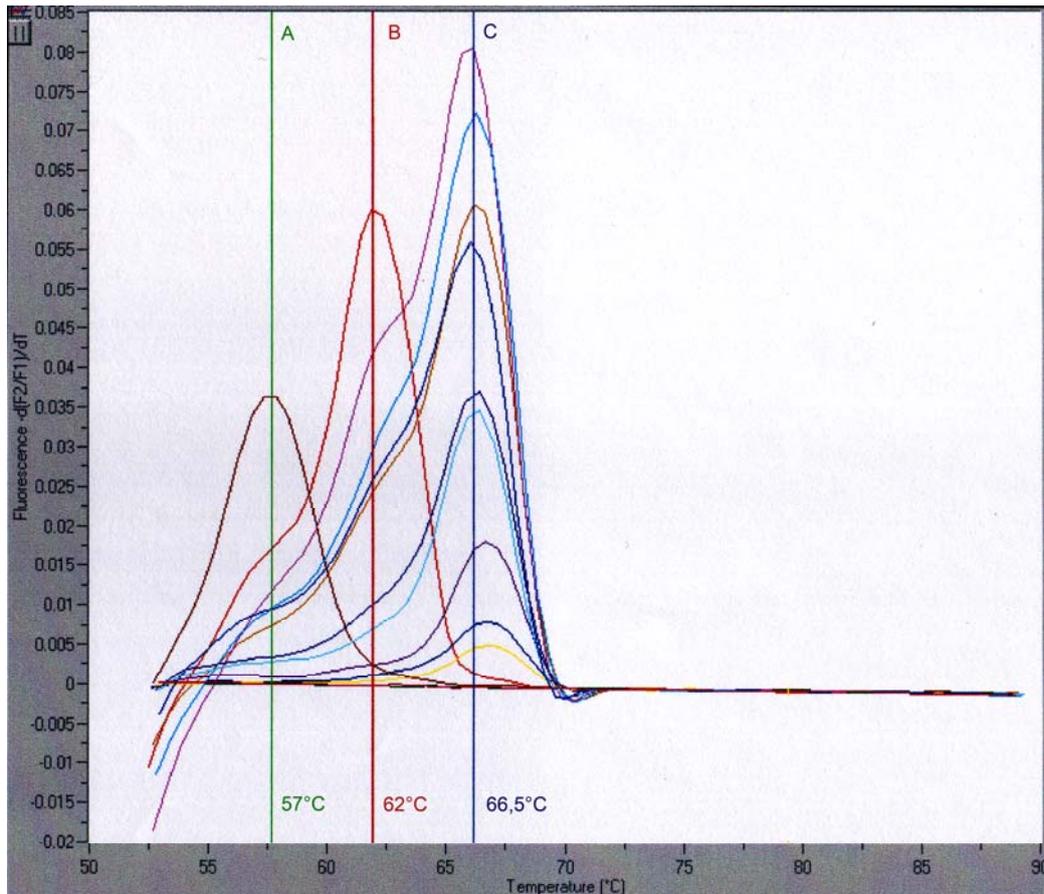


Abb.13: Die Abbildung zeigt die verschiedenen Schmelztemperaturen der mit Hilfe unserer PCR-Methode amplifizierten ds-DNA-Produkte.  
 A:  $T_m$  des JC-ds-DNA-Produkts; B:  $T_m$  eines BK-ds-DNA-Produkts mit isoliertem Basenaustausch im Bereich der Zielsequenz der Sensor-HybProbe; C:  $T_m$  des BK-ds-DNA-Produkts

Die  $T_m$  des BK-ds-DNA-Produkts liegt bei dem hier verwendeten HybProbe-Assay bei 65-67°C (s. Abb.13  $T_m$  C), die des JC-ds-DNA-Produkts bei 57-59°C (s. Abb.13  $T_m$  A), was den theoretisch zu errechnenden Werten entspricht.

Im Verlauf der Messungen wurde ein weiteres BK-ds-DNA-Produkt nachgewiesen, dessen  $T_m$  bei 60-63°C (s. Abb.13  $T_m$  B) liegt. Mit Hilfe einer Direktsequenzierung des PCR-Amplifikats (siehe Abb.16) konnte gezeigt werden, dass der Differenz der  $T_m$  ein einzelner Basenaustausch im Bereich der Zielsequenz der Sensor-HybProbe zugrunde liegt und die verschiedenen Schmelztemperaturen unterschiedlichen BK-Varianten und -Genotypen zuzuordnen sind.

### 3.1.5.2 Sequenzvergleiche

Eine weitere Methode der Spezifitätskontrolle ist der so genannte Sequenz-Abgleich. Hierbei wurden die Basensequenzen der verwendeten Primer und HybProbes mit den DNA-Sequenzen der internationalen DNA-Datenbank des NCBI (National Center for Biotechnology Information) des National Institutes of Health verglichen, um sicher zu stellen, dass die ausgewählten Primer und HybProbes ausschließlich mit gewünschten Zielsequenzen hybridisieren.

Für die Zielsequenzen der Primer konnte gezeigt werden, dass diese nur bei den beiden humanpathogenen Polyomaviren BKV und JCV sowie SV40 vorkommt. Bei der Zielsequenz für die Hybridisierungssonden (2.026.871 Sequenzen verglichen) ergaben sich ausschließlich Treffer für BK und JC, in keinem Fall wurde ein ausreichender Score für SV40 erreicht.

Die zu erwartenden Punktabweichungen für JC, BK ( $T_m$  62°C) und BK( $T_m$  68°C) fanden sich auch bei allen gefundenen Sequenzen in der NCBI-Datenbank.

### 3.1.5.3 PCR-Lauf mit SV40

Die Primer Py1-s und Py1-as binden an den Positionen 1576-1560 (Py1-s) und 1298-1315 (Py1-as) und somit an, bei BKV, JCV und SV40, konservierten Gensequenzen (Sequenz-Abgleich). Während die HybProbe BK-HP1-FL auch SV40 erkennt, weisen bei der HybProbe BK-HP1-LR alle SV40-Sequenzen an den Positionen 1532, 1534, 1538, 1541 und 1542 eine Basenabweichung auf (s.Abb. 16). Dadurch kommt es zu keiner Bindung dieser HybProbe an SV40 und damit zu keinem Signal bei der Amplifikation von SV40.

Zum Nachweis, dass die differentielle real-time PCR mit BK-HybProbes hochspezifisch für JCV- und BKV-DNA ist und bei SV40-DNA ein negatives Ergebnis bzw. kein Signal zeigt, diente folgender Versuch:

Von zwei BKV-DNA-Extrakten, einem SV40-DNA-Extrakt und einer Negativkontrolle wurde eine LC-PCR mit dem BK-HybProbe-Assay durchgeführt. Während die beiden BK-Proben ein deutliches Signal erzeugten, zeigten sowohl die SV40-Probe als auch die Negativkontrolle keinen Signalanstieg (s. Abb.14).

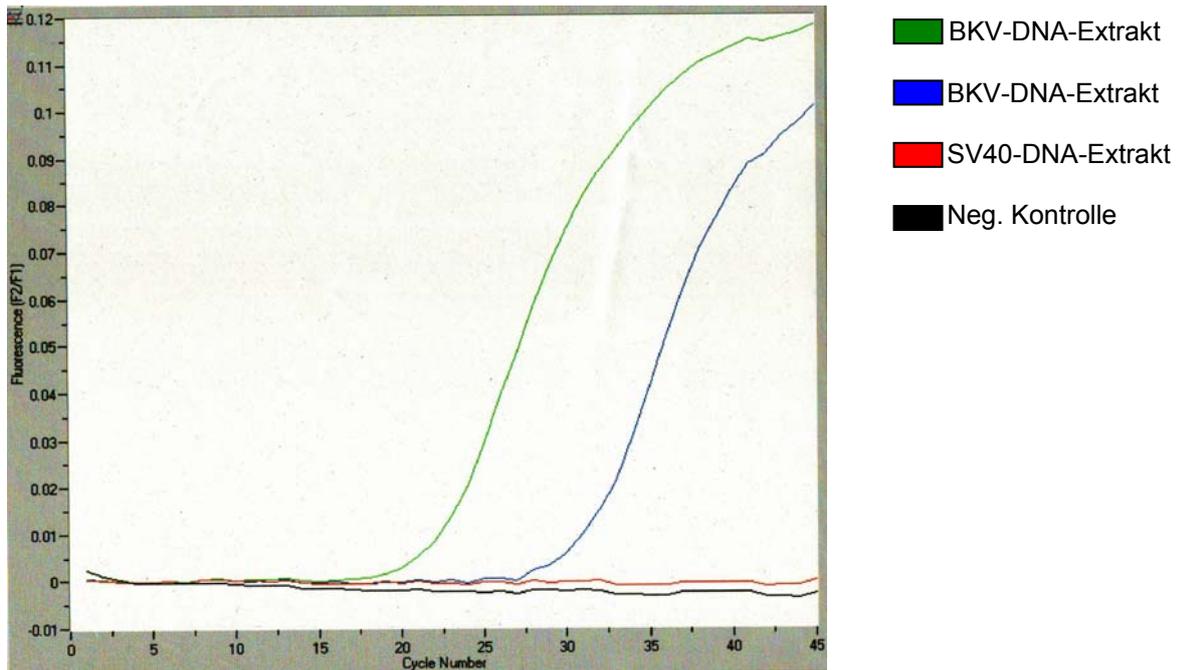


Abb. 14: Der LC-PCR-Lauf zeigt, dass die hochspezifischen BKV-HybPro und nicht an SV40-DNA. Somit wird auch nur bei Amplifikaten der BKV-DNA ein Signal erzeugt.

Im Anschluss an die PCR wurden die Amplifikate zur Gelelektrophorese auf ein 1,5%-iges Agarose-Gel aufgetragen. Hierbei erschienen die Banden der BKV-positiven und der SV40-positiven Proben auf gleicher Höhe (s. Abb. 15).

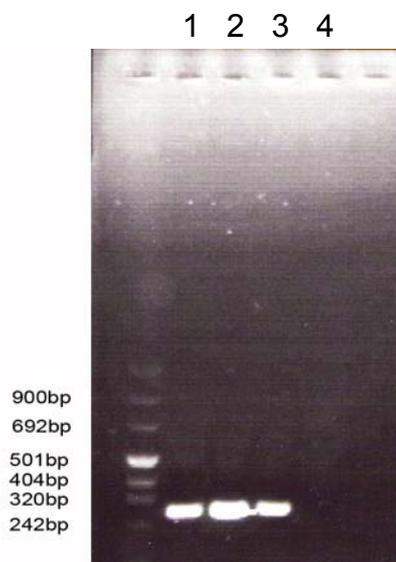


Abb. 15: Agarose-Gel der Amplifikate von Abb. 14 (zu erwartende Amplifikat-Länge 278bp).

- 1 BKV Amplifikate
- 2 BKV Amplifikate
- 3 SV 40-Amplifikate
- 4 Negativ Kontrolle

Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass zwar die BK-Primer wie gewünscht an SV40-DNA binden und es auch zu einer Amplifikation, sichtbar an einer positiven Bande im Agarose-Gel, kommt, die BK-HybProbes jedoch hochspezifisch für BKV-DNA sind.

#### 3.1.5.4 Sequenzierung

Der Goldstandard der Spezifitätskontrolle ist die Direktsequenzierung der PCR-Amplifikate. Von den drei, anhand ihrer Schmelzpunkte unterscheidbaren, Amplifikaten (s. Abb. 13) wurden jeweils vier mit der  $T_m$  68°C und 62°C sowie zwei mit der seltener gefundenen  $T_m$  57°C sequenziert .

Zur Sequenzierung wurden die Primer Py1-s und Py1-as verwendet. Es wurde jeweils in beiden Leserichtungen sequenziert. Zum Sequenzvergleich wurden nur die überlappenden und eindeutig lesbaren Sequenzdaten verwendet (s.Abb. 16).

Das Ergebnis dieses Versuchs lieferte einen weiteren Beweis für die Spezifität der differentiellen real-time-PCR und die Präzision der Schmelzkurvenanalyse.

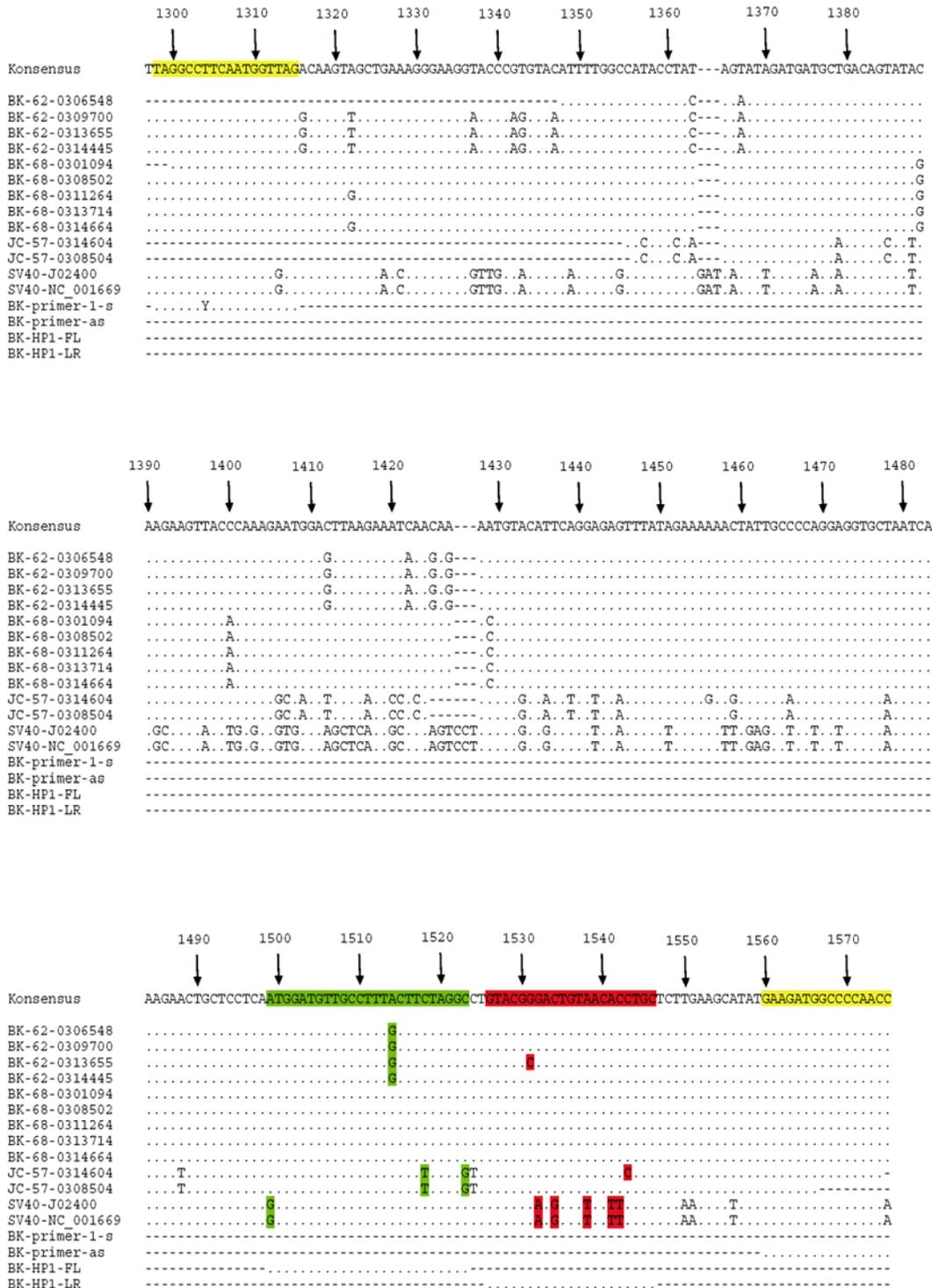


Abb.16: Alignment der sequenzierten Amplifikate und die daraus abgeleitete Konsensussequenz mit den verwendeten Primern und HybProbes..

Die Bezeichnung der Amplifikate bezieht sich auf die Viruspezies (BK, JC, SV40) und die im LC gemessene  $T_m$  des Isolates (62, 68, 57°C).

Positionen nach Referenz-Nr. NC\_001538. - = fehlt; . = identisch zur Konsensus-Sequenz.

Zuordnung der farblich unterlegten Abschnitte der Konsensussequenz:

gelb= Py1-s und Py1-as; grün=Py-HP1-FL; rot=Py-HP1-LR

### 3.2 Testung klinischer Proben

Im Rahmen unserer Messungen wurden 152 Nierentransplantat-Empfänger mittels differentieller real-time-PCR auf BKV- und JCV-DNA im Serum und im Urin untersucht. 18,4% (28/152) der Patienten entwickelten keine aktive BKV-Infektion, 81,6% (124/152) zeigten mindestens ein positives Messergebnis im Urin, wovon wiederum 12,9% (16/124) eine Virämie entwickelten. Die Gesamt-Prävalenz der JCV-DNA im Urin betrug 11,2% (17/152), eine JCV-Virämie kam nicht vor. Die Anzahl der Proben pro Patient lag zwischen 2 und 37 (im Mittel 8) für Plasma- und Urinproben zusammen.

#### 3.2.1 Qualitative Ergebnisse

Unter den 678 Serum- und 523 Urinproben, die auf BKV und JCV untersucht wurden, betrug der Anteil der BKV-DNA-positiven Proben 6,6% (45/678) im Serum und 62,3% (326/523) im Urin. Der Anteil der JCV-DNA-positiven Proben lag bei 0% (0/678) im Serum und 7,7% (40/523) im Urin.

Eine Analyse der 465 Paar-Proben (d.h. Urin- und Serumprobe wurde zum selben Zeitpunkt dem selben Patienten entnommen) zeigte, dass bei 54,8% (255/465) der Paare eine isolierte BK-Virurie vorlag, während bei 6,9% (32/465) eine BK-Virurie und –Virämie nachzuweisen war. Der Anteil der im Serum und im Urin BKV-negativen Paare betrug 38,3% (178/465). Eine BK-Virämie ohne BK-Virurie wurde nicht beobachtet.

#### 3.2.2 Quantitative Ergebnisse

Von den 326 BKV-positiven Urinproben betrug die Viruskonzentration bei 75,8% (247/326) der Proben weniger als  $1 \times 10^4$  Genome/ml und bewegte sich zwischen  $1,1 \times 10^4$  und  $3,3 \times 10^8$  Genomen/ml bei den verbleibenden 24,2% (79/326). In den Serumproben lag die Viruskonzentration bei 80% (36/45) der Proben unter  $6 \times 10^2$  Genomen/ml und betrug bei den übrigen 20% (9/45) zwischen  $1,1 \times 10^3$  und  $1,2 \times 10^4$  Genomen/ml.

Von den 40 JCV-positiven Urinproben lag die Viruskonzentration bei 90% (36/40) der Proben unter  $7 \times 10^2$  Genomen/ml, bei den übrigen 10% (4/40) rangierte sie zwischen  $1 \times 10^3$  und  $6,1 \times 10^3$  Genomen/ml.

### 3.2.3 BKV-Reaktivierungskinetiken bei Patienten

Zur Darstellung des Infektionsverlaufs wählten wir aus den 152 Patienten 26 aus, bei welchen Anzahl und zeitliche Verteilung der Messungen eine ausreichende Verlaufsbeurteilung zuließen.

Die Patientenverläufe wurden zur besseren graphischen Darstellbarkeit und Vergleichbarkeit in drei Gruppen eingeteilt. Der ersten Gruppe wurden die BKV-Reaktivierungsverläufe der Patienten zugeteilt, deren Virurie weniger als 10000 Genome/ml betrug, wobei die maximal erreichte Virurie in dieser Verlaufsgruppe bei 2000 Genomen/ml lag. In der zweiten und dritten Gruppe befinden sich die BKV-Reaktivierungskinetiken der Patienten, deren Virurie zu mindestens einem Messzeitpunkt über 10000 Genomen/ml lag, wobei der zweiten Gruppe die Serum-negativen und der dritten Gruppe die Serum-positiven Verläufe zugeteilt wurden. In der zweiten Gruppe wurde eine maximale Virurie von  $8,5 \times 10^6$  Genomen/ml erreicht, in der dritten Gruppe lag diese bei  $3,3 \times 10^8$  Genomen/ml.

Dieser Gruppeneinteilung geht unsere Beobachtung voraus, dass eine Virämie erst bei einer Virurie von mehr als 10000 Genomen/ml zu beobachten ist.

In den meisten Fällen waren uns auch die Serum-Kreatinin-Werte der Patienten bekannt und konnten graphisch mit dargestellt werden.

Die Proben wurden über einen Zeitraum von 0-700 Tagen, in einem einzigen Fall über einen Zeitraum von 200-900 Tagen post transplantationem [p.t.] gesammelt.

### Gruppe I

In der ersten Gruppe wurden 17 BKV-Reaktivierungsverläufe zusammengefasst, wobei in 12 Fällen auch Kreatinin-Werte über den gesamten Zeitraum vorlagen. Bei 16 der 17 Patienten kam es innerhalb der ersten 30 Tage p. t. zur Virurie. Sieben dieser anfänglich Urin-positiven Patienten erreichten innerhalb der ersten 100 Tage p. t. eine Urin-Negativität, weitere 4 Patienten innerhalb der ersten 200 Tage post Transplantation.

In den meisten Fällen kommt es nach einer mehr oder weniger langen Zeit der Negativität erneut zur Virusausscheidung im Urin. Bei der zeitlichen Verteilung der Spitzenwerte der mit dem Urin ausgeschiedenen Virusmengen, zeigt sich eine deutliche Häufung innerhalb der ersten 150 Tage p. t. (s. Abb.17).

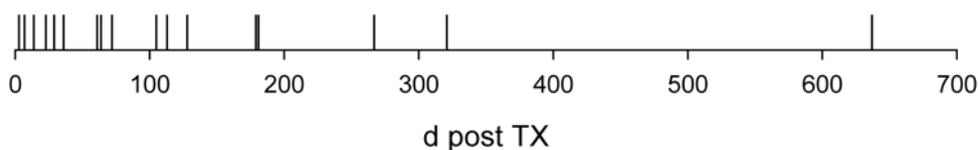


Abb.17: Zeitpunkt des BK-Maximums im Urin (Gruppe I).

Betrachtet man die Serum-Kreatinin-Werte, so fällt bei den BKV-Reaktivierungskinetiken der Patienten Nr.35 und Nr.126 ein zeitliches Zusammentreffen der vermehrten Virusausscheidung im Urin und einem plötzlichen Kreatininanstieg im Serum auf (s. Abb.18g und 18p). Bei dem Patienten Nr.126 scheint sogar die Höhe der Viruskonzentration im Urin mit der Höhe des Serum-Kreatinin-Wertes zu korrelieren.

Die Beobachtungen anhand dieser beiden Infektionskinetiken legen den Verdacht nahe, dass bereits niedrigtitrige BKV-Virusausscheidungen mit klinisch relevanten Reaktivierungen korrelieren.

Der Anteil der Patienten, bei dem zu mindestens einem Messzeitpunkt JCV-DNA im Urin nachweisbar war, liegt in Gruppe 1 bei 23,5% (4/17).

BKV-Reaktivierungskinetiken von insgesamt 26 ausgewählten Patienten, welche in drei Gruppen eingeteilt wurden. Zur besseren Vergleichbarkeit der Grafiken wurden alle Zeitachsen gleich gehalten und lediglich zwei verschiedene Skalierungen der x-Achse gewählt. Eine Skalierung für niedrigtitrige Reaktivierungsverläufe bis zu einer Virurie von 10000ge/ml und eine Skalierung für hochtitrige Verläufe bis zu einer Virurie von  $10^9$ ge/ml.

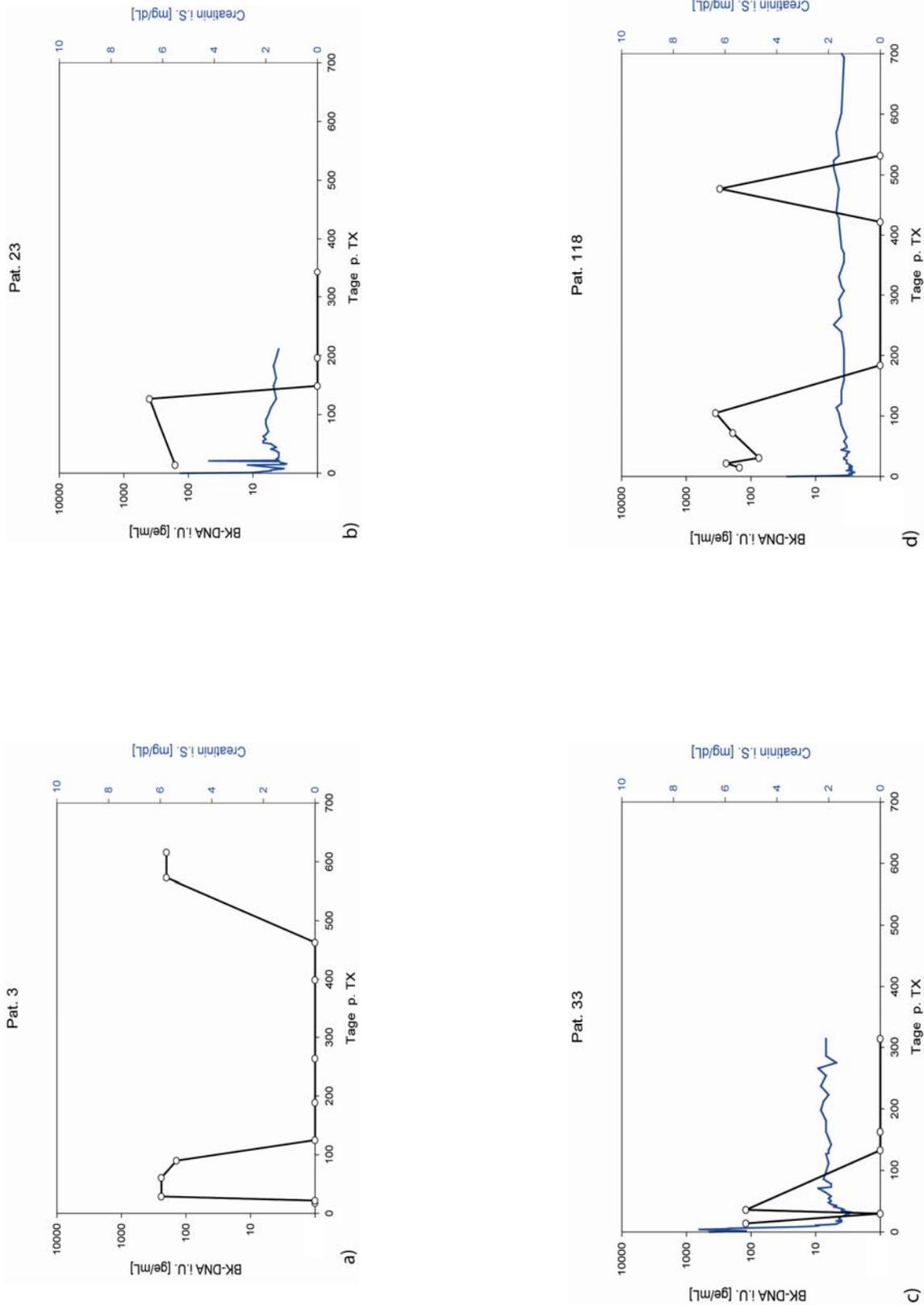


Abb. 18 a) – d): BKV-Reaktivierungskinetiken der Gruppe I

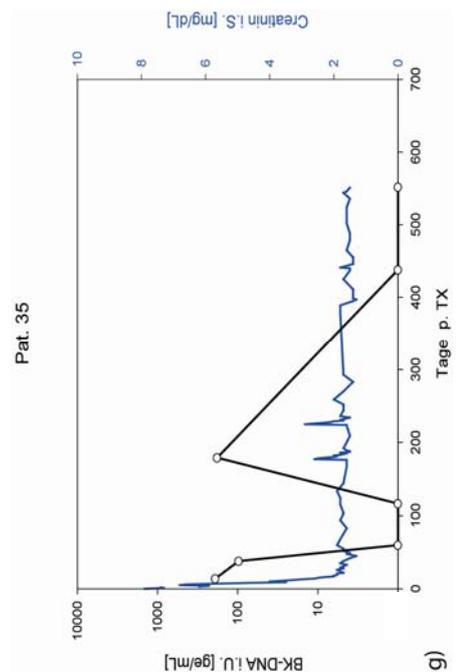
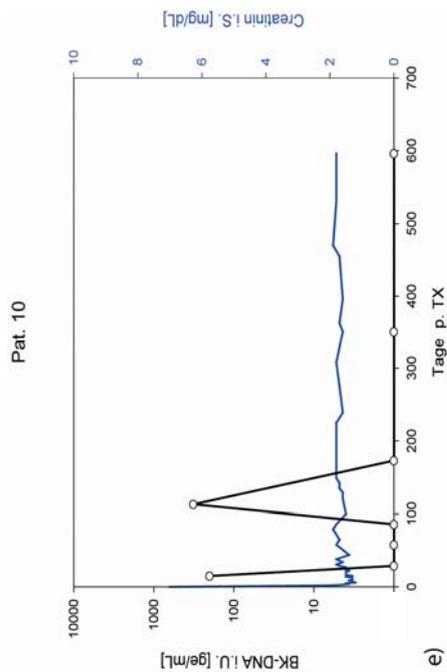
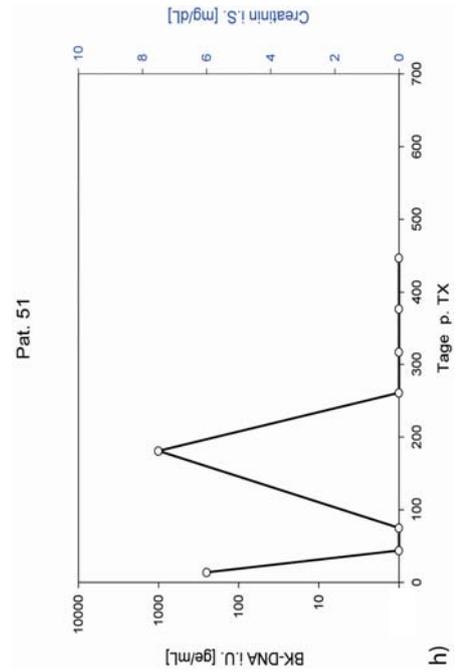
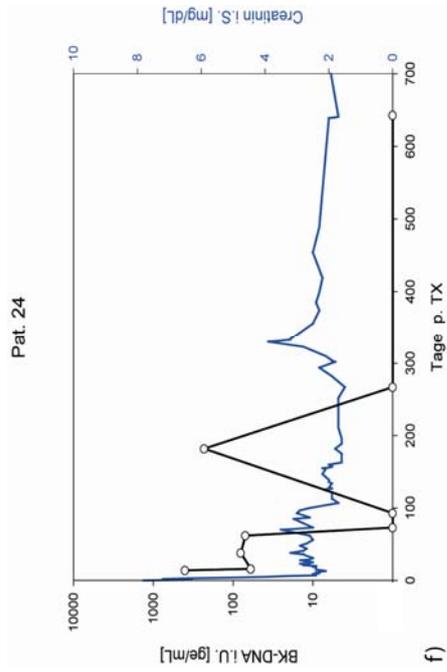


Abb.18 e) – h): BKV-Reaktivierungskinetiken der Gruppe I

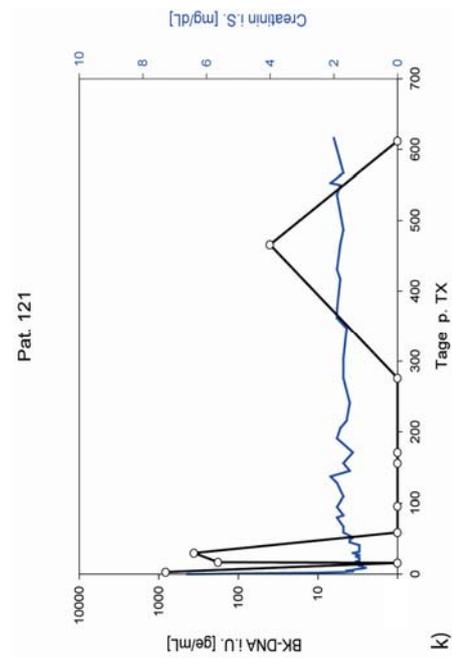
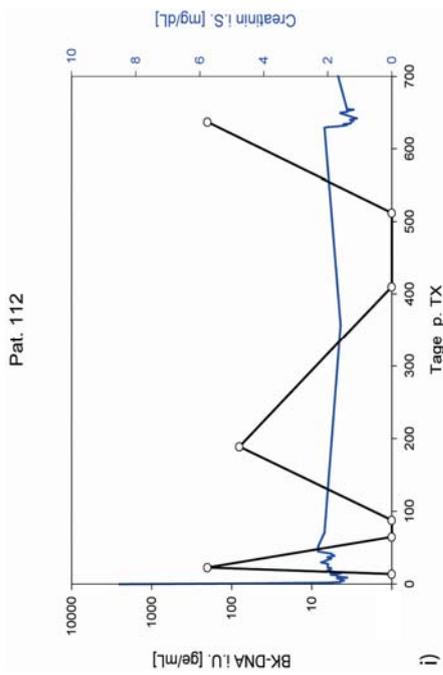
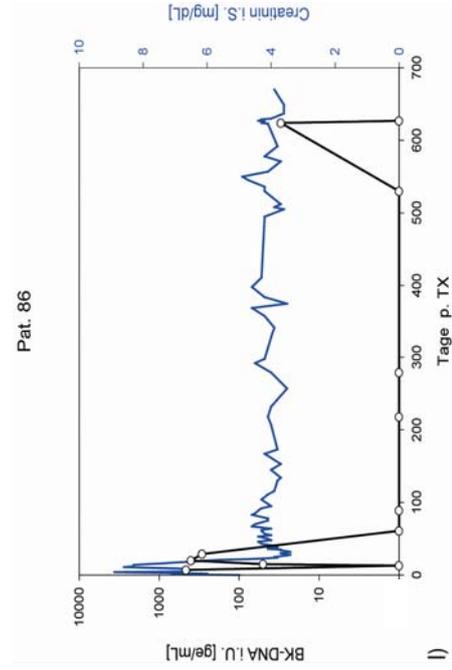
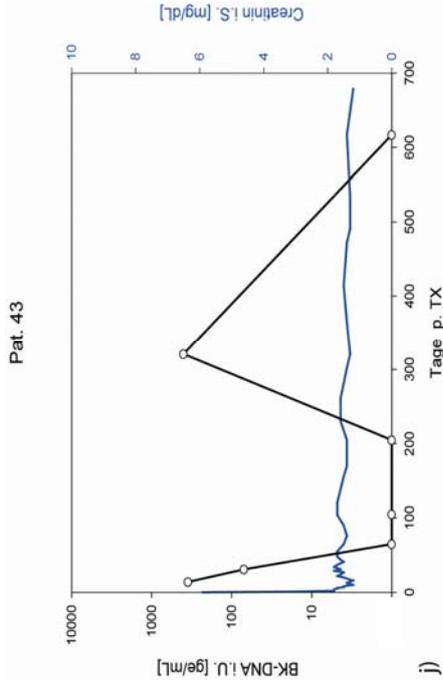


Abb. 18 i) – l): BKV-Reaktivierungskinetiken der Gruppe I

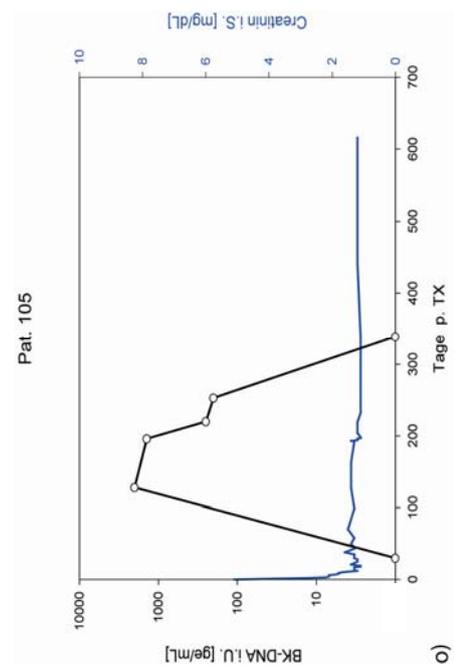
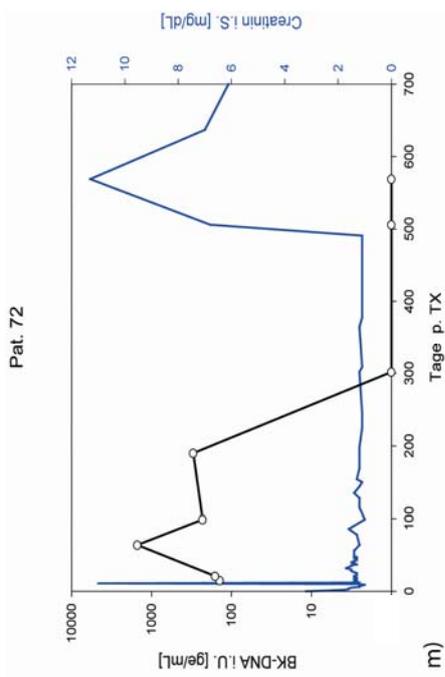
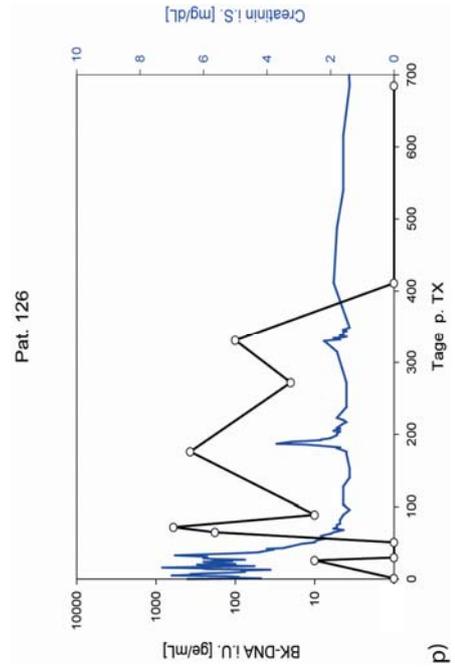
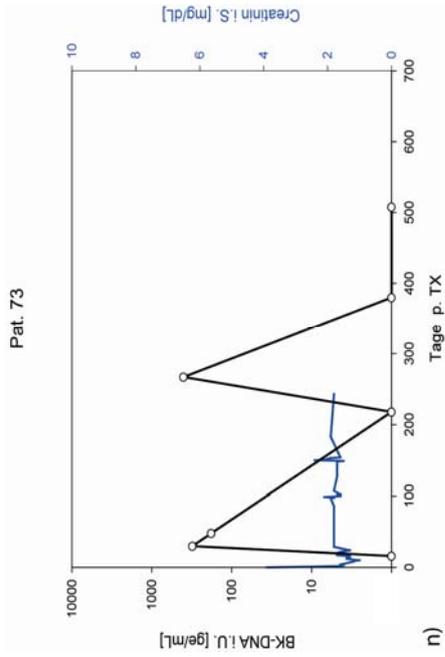


Abb. 18 m) – p): BKV-Reaktivierungskinetiken der Gruppe I

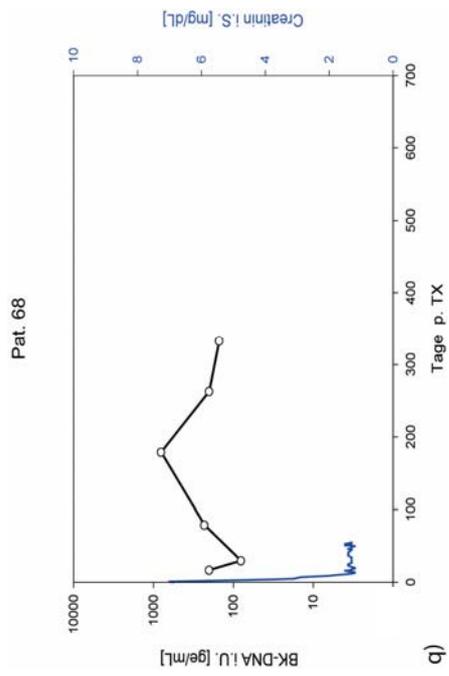


Abb. 18 q): BKV-Reaktivierungskinetik der Gruppe I

### Gruppe II

In Gruppe II befinden sich fünf BKV-Reaktivierungsverläufe, wovon bei zwei Patienten die Serum-Kreatinin-Werte für die Dauer der gesamten Messperiode vorlagen. In dieser Gruppe zeigten alle Patienten innerhalb der ersten 30 Tage p. t. eine Virurie. Vier der Patienten erreichten innerhalb der ersten 50 Tage p. t. eine kurzzeitige Urin-Negativität und stiegen anschließend mit den BKV-Ausscheidungswerten im Urin auf ihr Maximum an. Die Spitzenwerte der BK-Viruskonzentrationen im Urin wurden in dieser Gruppe zwischen dem 63. und dem 106. Tag p.t. erreicht (s. Abb.19).

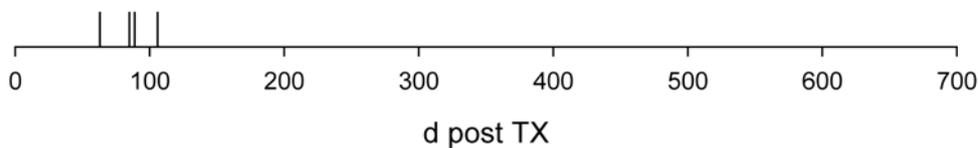


Abb. 19: Zeitpunkt des BK-Maximums im Urin (Gruppe II).

Bei wiederum vier der fünf Patienten reduzierte sich die BKV-Ausscheidung zwischen dem 200. und 400. Tag p. t. bis hin zur Urin-Negativität.

Trotz hochtitriger BKV-Reaktivierungen wurde in der Gruppe II kein entsprechender Anstieg der Kreatinin-Werte beobachtet.

Der Anteil der Patienten, bei dem zu mindestens einem Messzeitpunkt JCV-DNA im Urin nachweisbar war, liegt in Gruppe 2 bei 20,0% (1/5).

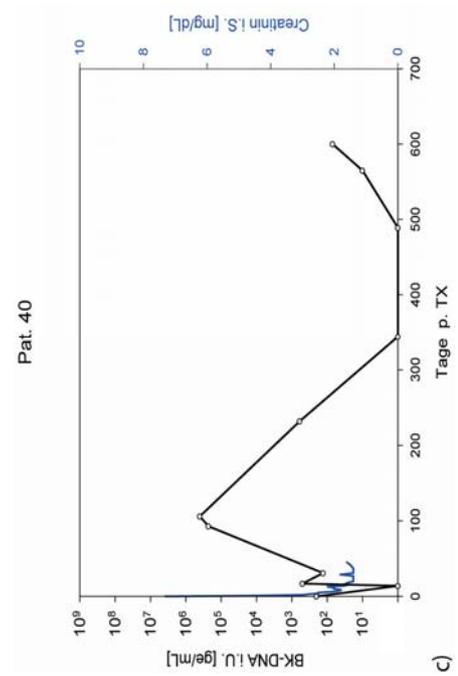
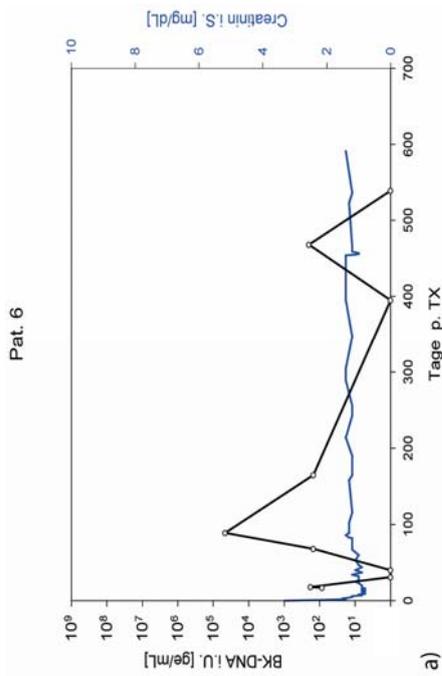
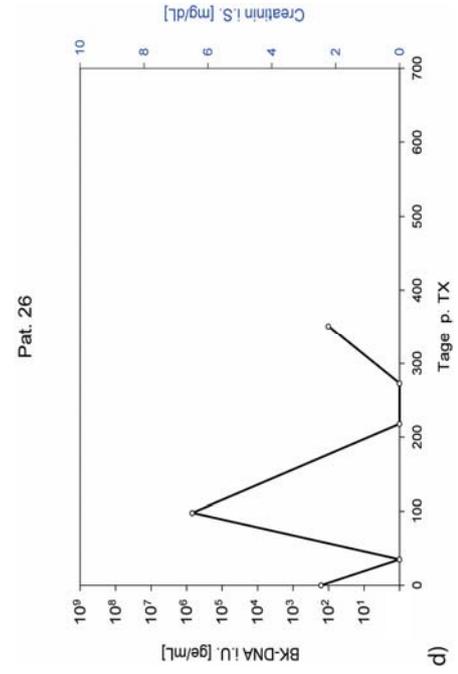
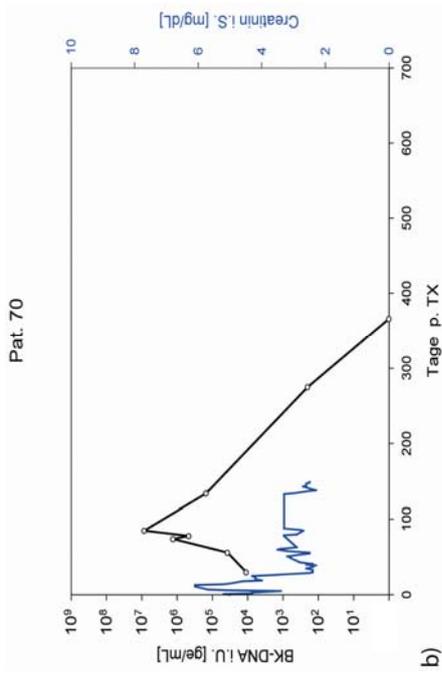


Abb.20 a)- d): BKV-Reaktivierungskinetiken der Gruppe II

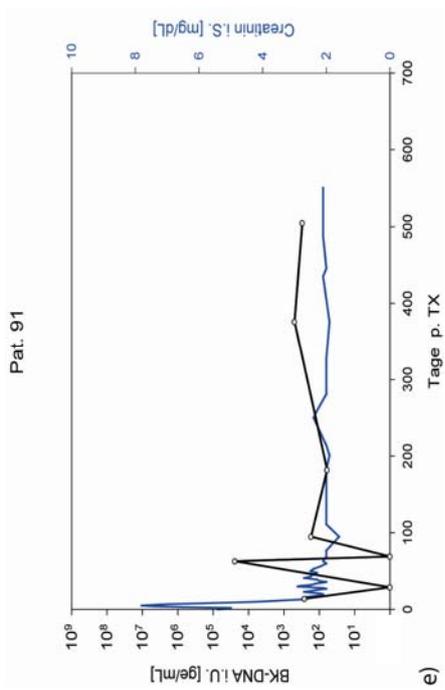


Abb.20 e): BKV-Reaktivierungskinetik der Gruppe II

### Gruppe III

In der dritten Gruppe wurden fünf BKV-Reaktivierungsverläufe zusammengefasst, die mindestens zu einem Messzeitpunkt im Serum positiv waren. Bei allen Verläufen lagen ebenfalls die Kreatinin-Werte über die gesamte Messzeit vor. Bei einem der Patienten erstreckte sich die Messperiode vom 200. bis 900. Tag p.t. statt vom 0. bis 700. Tag p.t. Von den vier in den ersten 30 Tagen p.t. auf BKV im Urin und im Serum untersuchten Patienten zeigten alle in dieser Phase eine BK-Virurie. Lediglich bei einem Patienten lag zu einem Messzeitpunkt eine Urin-Negativität vor. Bei allen anderen Patienten dieser Gruppe war zu jedem Messzeitpunkt eine BKV-Ausscheidung mit dem Urin nachweisbar.

Betrachtet man zusätzlich die BKV-Reaktivierungskinetiken im Serum, so fällt auf, dass diese auf niedrigerem Konzentrationsniveau nahezu parallel zu den jeweiligen BKV-Reaktivierungskinetiken im Urin verlaufen. Die Serum-Positivität entwickelte sich in den von uns beobachteten Fällen etwa 15 bis 65 Tage nach einem steilen Anstieg der BK-Virurie.

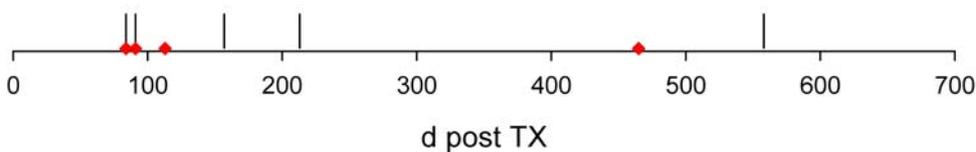


Abb.21: Zeitpunkt des BK-Maximums im Urin (Striche) und im Serum (Quadrate).

Bei drei der Patienten zeigte sich die maximal erreichte BK-Virurie zwischen dem 84. und dem 157. Tag p.t. im Serum zwischen dem 84. und 113. Tag p.t., während ein Patient seine BKV-Spitzenwerte erst am 558. Tag p.t. im Urin und am 465. Tag p.t. im Serum erreichte (s. Abb.21). Im Falle des Patienten, dessen erste Messwerte erst am 213. Tag p.t. erhoben wurden, sind diese, sowohl im Urin als auch im Serum, seine höchsten BKV-Messwerte.

Drei der fünf Patienten zeigten zu Zeiten deutlich erhöhter BK-Virusausscheidung mit dem Urin auch einen Anstieg der Serum-Kreatinin-Werte.

Bei keinem der Patienten in Gruppe 3 war JCV-DNA im Urin nachweisbar war.

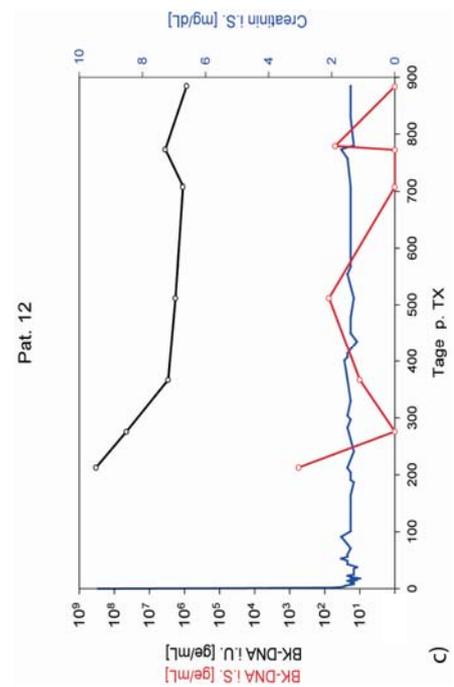
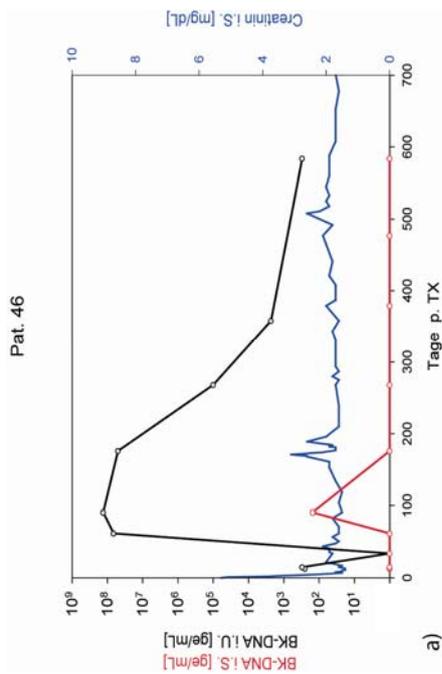
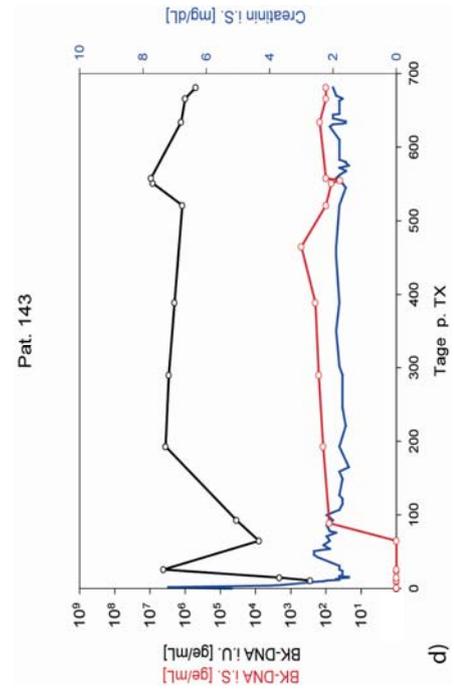
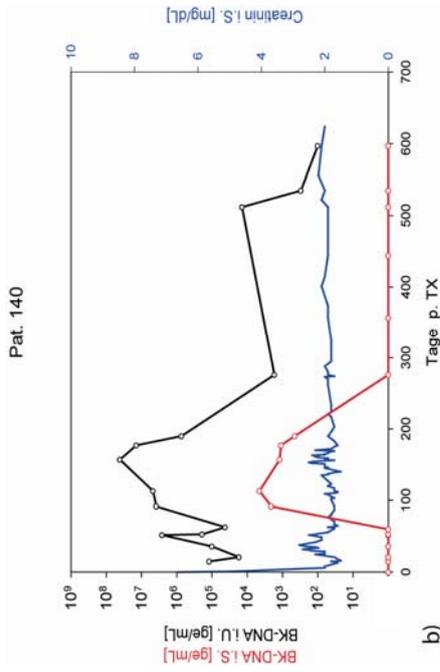


Abb.22 a) - d): BKV-Reaktivierungskinetiken der Gruppe III

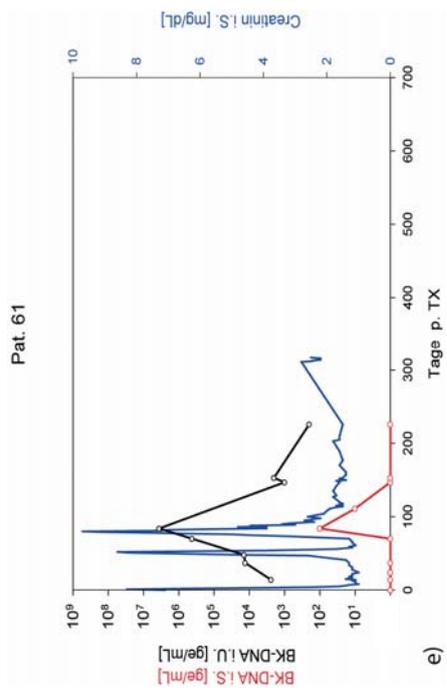


Abb.22 e): BKV-Reaktivierungskinetik der Gruppe III

## 4 Diskussion

### 4.1 Nachweis von BKV-Infektionen

Molekulare Studien zeigen, dass für die meisten PAN-Fälle das Polyomavirus hominis Typ1, bekannt als BK Virus, verantwortlich ist (Nickelait V et al., 1999; Hirsch HH et al., 2002; Ding R et al., 2002; Ramos ER et al., 2003; Moriyama T et al., 2003; Randhawa PS, Khaleel-Ur-Rehman K et al., 2002 und Rhandawa PS, Vats A et al., 2002). In weniger als 3% der berichteten Fälle spielt jedoch das Polyomavirus hominis Typ2, bekannt als JC Virus, eine Rolle (Baksh FK et al., 2001; Kazory A et al., 2003 und Hurault de Ligny B et al., 2000).

Wir entwickelten darum eine LC-PCR-Methode, die eine gleichzeitige Amplifikation der BKV- und JCV-DNA und deren Differenzierung, aufgrund unterschiedlichen Annealing-Verhaltens der eingesetzten Hybridisierungssonden, ermöglicht. Die PCR dient dem quantitativen Nachweis der BKV- und JCV-DNA in Urin- und Serumproben von Nierentransplantat-Empfängern.

Durch die weite Verbreitung der BKV-Infektion in der normalen Bevölkerung, sind die üblichen serologischen Tests bezüglich der Erkennung einer aktiven Infektion nur wenig aussagekräftig (Shah KV et al., 1973 und Gardner SD 1973). Die Urin-Zytologie lieferte widersprüchliche Ergebnisse. Es wurde davon berichtet, dass Decoy-Zellen im Urin (Nierentubuluszellen mit intranukleären viralen Einschlusskörperchen) bei 72% der Patienten mit BKV-Nephritis nicht nachweisbar seien (Nickelait V et al., 1999). Ebenso wurde berichtet, dass Decoy-Zellen im Urin bei 94% der Patienten ohne BKV-Nephritis gefunden wurden (Nickelait et al., 2000). Die elektronenmikroskopische Untersuchung von Urinproben ist eine gute Möglichkeit um Polyomaviren zu identifizieren, sie ist jedoch nicht quantitativ und erfordert nachfolgende Verfahren um BKV von JCV zu unterscheiden (Lin PL et al., 2001 und Howell DN et al., 1999). Nukleinsäure-basierenden Verfahren wird ein hohes Maß an Sensitivität zugesprochen. Nickelait et al. (Nickelait V et al., 2000) haben beobachtet, dass eine Untersuchung auf BKV-DNA im Plasma eine potentielle Möglichkeit darstellt, um Nierentransplantat-Empfänger mit BKV-Nephropathie zu identifizieren. Limaye et al. (Limaye AP et al., 2001) haben die BKV-konzentration in aufeinander folgenden Serumproben von 4 Patienten mit Biopsie-gesicherter BKV-

Nephropathie bestimmt und herausgefunden, dass die Messung der BKV-DNA im Serum die Patienten mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer BKV-Nephropathie oder bereits vorhandener Nephropathie identifiziert. Dem entgegen haben Tuzuner et al. (Tuzuner A et al., 2001) berichtet, dass Untersuchungen auf BKV-DNA in Blutproben keinen hohen Vorhersagewert bezüglich einer BKV-Nephritis haben und dass die Virus-Konzentration in Urin-Proben von Nierentransplantat-Empfängern mehr Informationen lieferte. Die Nadel-Biopsie des Nierentransplantats ist derzeit noch der genaueste Test zur Diagnose einer BKV-Nephritis (Mylonakis E et al., 2001; Nিকেleit V et al., 1999; Lin PL et al., 2001 und Soave R et al., 2001). Sie ist jedoch mit einem hohen Risiko für Komplikationen verbunden, wie z.B. Hämaturie, Anurie, perirenalem Hämatom, Blutung, Schock, arteriovenösen Fisteln und sogar Transplantat-Verlust. Die Tatsache, dass bei pädiatrischen Empfängern das Nierentransplantat oftmals intraabdominell liegt, was eine Biopsie deutlich erschwert, unterstreicht die Bedeutung noninvasiver diagnostischer Verfahren.

#### 4.2 LC-PCR Methode

Ein Nachteil der bisherigen DNA-basierenden Testverfahren ist, dass sie lediglich entweder BKV oder JCV quantitativ nachweisen oder aber beide Virustypen, ohne sie differenzieren zu können, wodurch unter Umständen falsch hohe Werte für die BKV bzw. JCV-DNA-Konzentrationen gemessen werden. Aufgrund dessen wollten wir ein real-time-PCR-Verfahren entwickeln, welches beides ermöglicht: einen quantitativen und differenziellen Nachweis von BKV und JCV in einem Messansatz.

Die Schwierigkeit lag hierbei in der Auswahl eines geeigneten Genomabschnitts, der ausreichende Gemeinsamkeiten zwischen dem BKV- und JCV-Genom aufweisen sollte, um ein Anlagern eines einzigen Primer- und HybProbe-Paares an die Genomabschnitte beider Viren zu ermöglichen. Dennoch mussten im Bereich der Sensor-HybProbe gerade so viele Basenfehlpaarungen vorliegen, dass eine Differenzierung zwischen Amplifikaten des JCV- und des BKV-Genoms aufgrund eines unterschiedlichen Schmelzverhaltens möglich wurde. Zudem sollte die zu amplifizierende Sequenz keinen häufigen Mutationen unterliegen, um die Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit des Tests zu gewährleisten.

Unsere Primer und Hybridisierungs sonden wurden schließlich einer hochkonservierten Region des JCV-/ BKV-VP2-Genoms angepasst, da diese

unseren Anforderungen gerecht wurde.

Um sicher zu stellen, dass die ausgewählten Primer und HybProbes ausschließlich mit den gewünschten Zielsequenzen hybridisieren, wurden die Basensequenzen der verwendeten Primer und HybProbes mit den DNA-Sequenzen der internationalen DNA-Datenbank des NCBI (National Center for Biotechnology Information) des National Institutes of Health verglichen. Die Primer binden zwar auch an den entsprechenden Genom-Abschnitt des SV40, dem dritten beim Menschen nachgewiesenen Polyomavirus, die Hybprobes jedoch sind für das BKV- und JCV-Genom hochspezifisch, so dass es bei der Durchführung der LC-PCR mit SV40-positiven Proben zu keinem Signalanstieg kommt. Den Beweis hierfür lieferte uns die Durchführung eines PCR-Laufs mit einem SV40-DNA-Extrakt und anschließender Gelelektrophorese. Mit Hilfe der Direktsequenzierung der PCR-Amplifikate unterschiedlicher Schmelztemperatur konnte die Spezifität der PCR-Methode und die Präzision der Schmelzkurvenanalyse belegt werden. Unsere differenzielle real-time-PCR stellt folglich eine kostengünstigere und weniger arbeitsintensive Methode zum Nachweis einer BKV- und JCV-Koinfektion dar, da aufwendiges Klonieren und Sequenzieren entfallen.

Dies ist die erste publizierte PCR-Methode, mit der ein simultaner und differentieller quantitativer Nachweis dieser beiden Viren in einem Messansatz möglich ist.

#### 4.3 Bedeutung des JCV für die PAN

Unsere Messungen mittels der von uns entwickelten real-time PCR sollten unter anderem Aufschluss über die Bedeutung des JCV für die Entwicklung einer PAN geben. Bisherige Forschungsergebnisse besagen, dass, wann immer JCV in der Niere eines Patienten mit PAN identifiziert wurde, BKV ebenfalls nachweisbar war (Baksh FK et al., 2001; Randhawa P et al., 2001). Mei-Chin Wen et al. konnten im Nierentransplantat eines an PAN erkrankten Patienten JCV mit Hilfe VP1 Peptid-spezifischer Antikörper und DNA-Sequenzierung nachweisen. Sie berichten jedoch nicht über gleichzeitige Untersuchungen auf BKV, wodurch schwer zu sagen ist, ob das JC Virus in dem beschriebenen Fall für die Entstehung der PAN verantwortlich war oder ob es eher eine untergeordnete Rolle im Rahmen einer Koinfektion spielte (Mei-Chin Wen et al. 2004). Unsere Ergebnisse sind in Einklang mit den Beobachtungen, dass JCV bisher nicht als alleiniger Grund einer PAN ausgemacht

werden konnte. Wir konnten keinen Zusammenhang zwischen der JCV-Konzentration im Urin und einer Einschränkung der Nierenfunktion herstellen. JCV im Serum konnte in Übereinstimmung mit der Literatur bei keinem unserer Patienten nachgewiesen werden.

#### 4.4 Bedeutung der BKV-Ausscheidung für den Nachweis der PAN

Ein weiteres Ziel unserer Untersuchungen betraf eine Verlaufsbeobachtung der BKV-Reaktivierungen nach Nierentransplantation. Insgesamt lagen uns von 152 Nierentransplantat-Empfängern Serum- und Urinproben vor, wovon lediglich bei 26 Patienten Anzahl und zeitliche Verteilung der Messungen eine ausreichende Verlaufsbeobachtung zuließen.

Bei den 26 Patienten betrug die Gesamtprävalenz der BKV-DNA im Urin und im Serum 81,6% und 10,5%. Unsere Untersuchungen erfolgten nicht als prospektive Studie. Jedoch wurden von anderen Forschungsgruppen, deren Messungen ebenfalls mittels nicht quantitativer real-time PCR bzw. anderer qualitativer NATs erfolgten mit 77% (Leung AY et al., 2002 und Cirocco R et al., 2001) und 13% (Hirsch HH et al., 2002) ähnliche Prävalenzen der BKV-DNA im Urin und im Serum beschrieben. In einer prospektiven longitudinalen Studie mit 104 Nierentransplantat-Empfängern wurden mittels einfacher BK-real-time PCR Prävalenzen von 57% für eine DNA-Urie und 29% für eine DNA-Ämie beobachtet (Bressollette-Bodin C et al., 2005).

Entsprechend den Beobachtungen im Rahmen dieser Studie (Bressollette-Bodin C et al., 2005) konnten auch wir anhand der 26 Reaktivierungskinetiken feststellen, dass eine BKV-Reaktivierung in den meisten Fällen bereits innerhalb der ersten drei Monate p. t. auftritt. Bei der Betrachtung der Zeitpunkte der maximalen BKV-DNA-Konzentration im Urin unserer Patienten fällt eine Häufung im dritten und vierten Monat p. t. auf. Auch liegen die Zeitpunkte einer maximalen BKV-DNA-Konzentration im Serum bei drei von vier Patienten in diesem Zeitfenster (s. Abb. Nr.23).

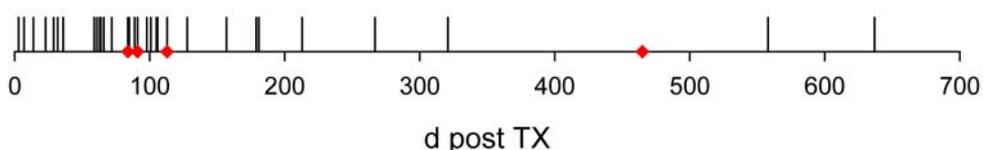


Abb.23: Zeitpunkt des BK-Maximums im Urin (Striche) und im Serum (Quadrate).

Dies überrascht wenig, da man, Berichten über CMV und EBV zufolge, weiß, dass die virale Replikation während der ersten sechs Monate p. t. durch die immunsuppressive Therapie gefördert wird und vorhandene Immunglobuline mit entsprechender Halbwertszeit in dieser Phase erheblich reduziert sind.

Die Wahrscheinlichkeit der Präsenz von BKV-DNA im Serum ist mit dem Vorliegen einer hohen Viruskonzentration im Urin verbunden. Unsere Untersuchungsergebnisse deuten darauf hin, dass eine BK-Virämie erst ab einer Virurie von mehr als  $10^4$  Genomen/ml auftritt (s. Abb.24).

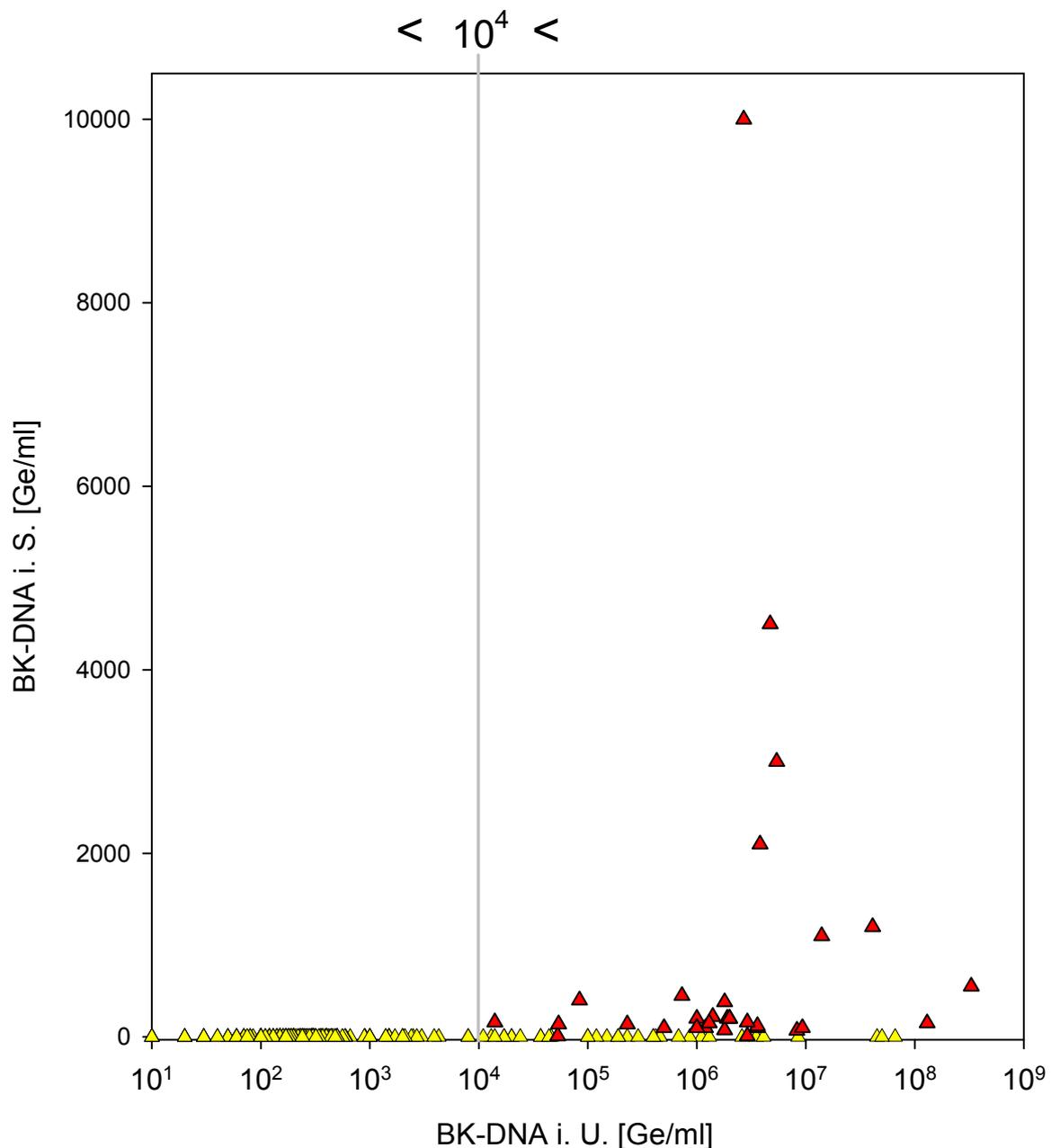


Abb.24: In die Grafik wurden die Daten aller Paarproben eingetragen. Es fällt auf, dass erst ab einer BKV-Konzentration von  $10^4$  Genomen/ml eine Serum-Positivität auftritt. Die gelben Dreiecke stellen die BKV- Konzentration im Urin, die roten Dreiecke die BKV- Konzentration im Serum dar.

Diese Beobachtungen decken sich mit denen von Bressollette-Bodin et al. (Bressollette-Bodin C et al., 2005). Während Bressollette-Bodin et al. seltsamerweise berichten, bei drei Patienten eine Virämie ohne bestehende Virurie vorgefunden zu haben, trat ein solcher Fall unter den von uns beobachteten Patienten nicht auf (Bressollette-Bodin C et al., 2005), was den Erwartungen entspricht. Unsere Untersuchungsergebnisse sind mit der Hypothese in Einklang zu bringen, dass es nach der Reaktivierung des BKV im Nieren-Tubulus-Epithel über das peritubuläre Kapillar-System zu einer Passage des Virus in den Blutstrom kommt und somit zur beobachteten BKV-Virämie (Nickeleit V et al., 2000).

#### 4.5 Prognostischer Wert der BK-Virurie

Auf der Suche nach einem diagnostischen Marker mit Vorhersagewert bezüglich des Risikos des Nierentransplantat-Empfängers eine PAN zu entwickeln stellt sich die Frage, ob die BKV-Konzentration im Urin als geeigneter Früh-Indikator dienen könnte.

Eine Studie, welche die Viruskonzentration im Urin von Nierentransplantat-Empfängern mit asymptomatischer Virurie, aktiver PAN und überstandener PAN verglich, schlug  $10^7$  Genome/ml als Cut-off-Wert für eine PAN vor (Rhandawa P et al., 2004). Dementgegen stehen unsere Beobachtungen, dass bei einigen Patienten bereits bei einer Virurie von weniger als  $10^7$  Genomen/ml eine Einschränkung der Nierenfunktion, gemessen am Serum-Kreatinin-Spiegel, beobachtet werden kann. In anderen Fällen wiederum zeigte sich bei einer Virurie von mehr als  $10^7$  Genomen/ml keine renale Dysfunktion. Besonders erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang unsere Beobachtung bei zwei Patienten, dass selbst bei einer maximal gemessenen Virurie von  $10^3$  Genomen/ml ein zeitliches Zusammentreffen der vermehrten Virusausscheidung im Urin mit einem plötzlichen Kreatinin-Anstieg im Serum vorkommt (s. Abb.18g und p). Dies deutet darauf hin, dass selbst BKV-Reaktivierungen mit einer geringen Virusausscheidung im Urin Einfluss auf die Nierenfunktion nehmen können. Aus unseren Untersuchungsergebnissen schließen wir, dass eine einmalige BKV-Quantifizierung im Urin zur Entscheidung darüber, ob ein Nierentransplantat-Empfänger ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer PAN hat, nicht ausreicht sondern erst eine kinetische Beurteilung über einen Vorhersagewert verfügt.

#### 4.6 Prognostischer Wert der BK-Virämie

Dieselbe Frage bezüglich eines prognostischen Stellenwertes stellt sich für die BK-Virämie. Verschiedene Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass eine BK-Virämie den charakteristischen, histopathologischen Veränderungen einer BKV-Nephropathie um Wochen bis Monate vorausgeht (Limaye AP et al., 2001). Limaye et al. und Nickleit et al. sehen in dem quantitativen Nachweis der BKV-DNA im Serum ein potentielles noninvasives Verfahren zur frühzeitigen Diagnostik einer PAN (Limaye AP et al., 2001 und Nickleit V et al., 2004). Zwei weitere Studien stützen diese These und schlagen als Cut-off-Werte der Viruskonzentration im Serum für die Entwicklung einer PAN  $7,7 \times 10^3$  Genome/ml (Hirsch HH et al., 2002) und  $10^5$  Genome/ml (Randhawa PS et al., 2004) vor. Bei den von uns beobachteten fünf Serum-positiven Reaktivierungskinetiken wurden diese beiden Cut-off-Werte nicht erreicht. Die höchste Viruskonzentration im Serum betrug bei den im Verlauf beobachteten Patienten in einem Fall  $4,5 \times 10^3$  Genome/ml. In den übrigen vier Fällen lagen die gemessenen Virämie-Spitzenwerte unter  $1 \times 10^3$  Genomen/ml. Sowohl der Patient mit relativ hoher Viruskonzentration im Serum als auch zwei der Patienten mit eher niedrigtitrigen BKV-Virämien zeigten eine Einschränkung der Nierenfunktion. Die Anzahl unserer Serum-positiven Proben ist nicht ausreichend, um endgültige Schlüsse daraus zu ziehen. Es deutet sich jedoch an, dass ein genereller Cut-off-Wert für die BK-Viruskonzentration im Serum zur Diagnose einer PAN nicht sinnvoll ist. Diese Vermutung steht in Einklang mit den Ergebnissen der prospektiven longitudinalen Studie von Bressollette-Bodin et al., bei welcher 13 Patienten den ersten Cut-off-Wert erreichten und sechs Patienten den zweiten, ohne dass ein signifikanter Zusammenhang zu den gemessenen Serum-Kreatinin-Spiegeln zu erkennen war (Bressollette-Bodin C et al., 2005).

Anhand unserer Ergebnisse können wir feststellen, dass der Anteil der Patienten, die zum Zeitpunkt einer vermehrten Virusausscheidung einen Funktionsverlust der Nierenfunktion zeigen, unter den BKV-Serum-positiven deutlich höher liegt, als unter den BKV-Serum-negativen. Zudem ist unseren eigenen Verlaufsbeobachtungen zufolge ein Anstieg der BKV-DNA-Konzentration im Urin um zwei log-Stufen und einer erreichten BKV-DNA-Konzentration im Urin  $>10^4$  Ge/ml mit der Gefahr einer BKV-DNA-Positivität im Serum verbunden (s. Abb. 24), mit der möglichen Folge einer PAN innerhalb von zwei Wochen.

Aufgrund unserer Untersuchungsergebnisse empfehlen wir zur frühzeitigen Diagnostik einer PAN innerhalb des ersten Jahres p. t. eine engmaschige Kontrolle der Virus Konzentration im Urin und die Beurteilung der Viruskinetik unter Berücksichtigung der laborchemischen Parameter der Nierenfunktion. Sollte ein rascher Anstieg der BKV-DNA- Konzentration im Urin um mehr als zwei log-Stufen auf eine BKV-DNA- Konzentration im Urin  $>10^4$  Ge/ml vorliegen, empfehlen wir erst dann eine zusätzliche Untersuchung der BKV-DNA- Konzentration im Serum. Die Quantifizierung des BKV im Urin sollte sinnvollerweise mit Untersuchungsabständen von jeweils zwei Wochen innerhalb des ersten halben Jahres p. t. und von jeweils einem Monat innerhalb des zweiten halben Jahres durchgeführt werden. Ab dem zweiten Jahr p.t. halten wir Screening-Intervalle von zwei Monaten für vertretbar bzw. eine sofortige Kontrolle von BKV im Urin und Serum bei klinischen Symptomen für geboten.

#### 4.7 Ausblick

Aus den dargelegten Verlaufsbeobachtungen der BKV-Reaktivierungen bei Nierentransplantatempfängern und dem Wissen über die mögliche Entwicklung einer PAN mit drohendem Organverlust ergeben sich wichtige Fragestellungen für weitere Untersuchungen.

Die Suche nach einem virusdiagnostischen Marker als einzigen prognostischen Parameter bezüglich des Risikos eine PAN zu entwickeln, dürfte aufgrund der multifaktoriellen Ätiologie einer BKV-Reaktivierung und der vielfältigen Risikofaktoren, Therapieschemata und BKV-Varianten auch in Zukunft schwierig bleiben. Hilfreich für die Einschätzung des Risikos des einzelnen Nierentransplantat-Empfängers wird die genauere Beurteilung individueller Risikofaktoren sein. Ein besonderes Augenmerk sollte hierbei auf dem vermuteten Zusammenhang zwischen neueren Immunsuppressiva und der Entwicklung einer PAN liegen. Dazu würden umfangreichere klinische Studien notwendig sein.

Unabhängig von der schwierigen Einschätzung eines individuellen Risikos vor Transplantation ist ein frühzeitiges Erkennen einer Reaktivierung im Einzelfall nach wie vor der Königsweg, um durch Modifikation der Immunsuppression oder dank einer Klärung einer plötzlichen Verminderung der Nierenfunktion eindeutig und rechtzeitig zwischen Abstoßungsreaktion und klinischer BKV-Reaktivierung

unterscheiden zu können. Die bisherigen Empfehlungen basierten auf einem Nachweis einer bereits klinisch manifesten BKV-Reaktivierung wohingegen die vorliegende Arbeit durch die kinetische Analyse einer Reaktivierung im Urin den behandelnden Nephrologen wesentlich früher auf eine Gefahr aufmerksam macht und ihm dadurch zusätzliche und rechtzeitige Handlungsoptionen eröffnet.

Von virologischer Seite wäre noch eine mögliche Sequenzvarianz der Nicht-regulatorischen Region des BKV und der Einfluß verschiedener Immunsuppressiva auf diese zu untersuchen. Auch ist die Frage zu klären, ob eine wirkliche endogene Reaktivierung eines adaptierten Virusstammes vorliegt oder vielmehr eine durch das Transplantat eingebrachte Superinfektion mit einer neuen Variante das Risiko und die Pathogenese einer PAN bestimmen. Lägen p.t. somit zwei Virusstämme vor, könnte man auch eine mögliche Interaktion beider oder einen Einfluß der bereits durch das endogene Virus vorhandenen Antikörper bzw. T-Zellen auf die Infektion mit einem neuen Stamm untersuchen.

Insgesamt eröffnet die Untersuchung von Viren, die wie die humanen Polyomaviren unter nicht-immunsuppressiven Bedingungen keine nachweisbare Pathogenität besitzen, neue Einblicke in die evolutionäre Adaptation von Virus und Wirt und darüber hinaus in die Pathogenitätsmechanismen von Virusinfektionen.

## 5 Literaturverzeichnis

Agha I, Brennan DC. BK virus and current immunosuppressive therapy. *Graft* 2002; 5: 65.

Agostini HT, Yanagihara R, Davis V, et al. Asian genotypes of JC virus in Native Americans and in a Pacific Island population: Markers of viral evolution and human migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 14542-14546.

Al Jedai AH, Honaker MR, Trofe J, et al., Renal allograft loss as the result of polyomavirus interstitial nephritis after simultaneous kidney-pancreas transplantation: results with kidney retransplantation. *Transplantation* 2003; 75: 490-494.

Allawi HT, Santa Lucia J Jr. Thermodynamics and NMR of Internal G:T Mismatches in DNA. *Biochemistry* 1997; 36: 10581-10594.

Allawi HT, Santa Lucia J Jr. Thermodynamics of Internal C:T Mismatches in DNA. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 2694-2701.

Allawi HT, Santa Lucia J Jr. Nearest-neighbor thermodynamics of internal A:C mismatches in DNA: Sequence dependence and pH effects. *Biochemistry* 1998; 37: 9435-9444.

Allawi HT, Santa Lucia J Jr. Nearest neighbor thermodynamic parameters for internal G:A mismatches in DNA. *Biochemistry* 1998; 37: 2170-2179.

Andrews CA, Shah KV, Daniel RW, Hirsch MS and Rubin RH, A serological investigation of BK virus and JC virus infections in recipients of renal allografts. *J Infect Dis* 1988; 158: 176-181.

Baker TS, Olson NH, Fuller SD et al. Adding the Third Dimension to Virus Life Cycles: Three-Dimensional Reconstruction of Icosahedral Viruses from Cryo-Electron Micrographs. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Dec. 1999: 862-922.

Baksh FK, Finkelstein SD, Swalsky PA, et al. Molecular genotyping of BK and JC viruses in human polyomavirus-associated interstitial nephritis after renal transplantation. *Am J Kidney Dis* 2001; 38: 354.

Barbanti-Brodano G, Martini F, De Mattei M, et al. BK and JC human polyomaviruses and simian virus 40: Natural history of infection in humans, experimental oncogenicity, and association with human tumors. *Adv Virus Res* 1998; 50: 69-99.

Bedi A, Miller CB, Hanson JL et al. Association of BK virus with failure of prophylaxis against hemorrhagic cystitis following bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 1995; 13: 1103-1109.

Binet I, Nickeleit V, Hirsch HH, et al. Polyomavirus disease under new immunosuppressive drugs: a cause of renal graft dysfunction and graft loss. *Transplantation* 1999; 67: 918-922.

Bratt G, Hammarin AL, Grandien M, Hedquist BG, Nennesmo I, Sundelin B, Seregard S. BK virus as the cause of meningoencephalitis, retinitis and nephritis in a patient with AIDS. *AIDS* 1999; 13(9):1071-5.

Brennan DC, Agha I, Bohl DL, et al. Incidence of BK with tacrolimus versus cyclosporine and impact of preemptive immunosuppression reduction. *Am J Transplant* 2005; 5: 582.

Bressollette-Bodin C, Coste-Burel M, Hourmant M, Sebille V, Andre-Garnier E and Imbert-Marcille BM. A Prospective Longitudinal Study of BK Virus Infection in 104 Renal Transplant Recipients. *Am J Transplant* 2005; 5: 1926-1933.

Brown DW, Gardner SD, Gibson PE and Field AM, BK virus specific IgM responses in cord sera, young children and healthy adults detected by RIA. *Arch Virol* 1984; 82: 149-160.

Buehrig CK, Lager DJ, Stegall MD, et al. Influence of surveillance renal allograft biopsy on diagnosis and prognosis of polyomavirus-associated nephropathy. *Kidney Int* 2003; 64: 665-673.

Carswell S, Alwine JC. Simian virus 40 agnoprotein facilitates perinuclear-nuclear localization of VP1, the major capsid protein. *J Virol* 1986; 60: 1055-1061.

Chen CH, Wen MC, Wang M, et al. A regulatory region rearranged BK virus is associated with tubulointerstitial nephritis in a rejected renal allograft. *J med Virol* 2001; 64: 82-88.

Cinque P, Casari S, Bertelli D. Progressive multifocal leukoencephalopathy, HIV, and highly active antiretroviral therapy. *N Engl J Med* 1998; 339: 848-849.

Cirocco R, Markou M, Rosen A et al. Polyomavirus PCR monitoring in renal transplant recipients: detection in blood is associated with higher creatinine values. *Transplant Proc* 2001; 33: 1805-1807.

Clifford DB. Natural history of progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) in AIDS modified by antiretroviral therapy. *J Neurovirol* 1998; 4: 346.

Coleman DV, Gardner SD, Mulholland C et al. Human polyomavirus in pregnancy. A model for the study of defence mechanisms to virus reactivation. *Clin Exp Immunol* 1983; 53: 289-296.

Crawford L, Cole CN, Smith AE, et al. The organization and expression of simian virus 40's early genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75: 117-122.

Cundy KC, Petty BG, Flaherty J, et al. Clinical pharmacokinetics of cidofovir in human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1247-1252.

Ding R, Medeiros M, Dadhania D, et al. Noninvasive diagnosis of BK virus nephritis by measurement of messenger RNA for BK virus VP1 in urine. *Transplantation* 2002; 74: 987.

Dörries K: JC-Virus (JCV), BK-Virus (BKV) und andere Polyomaviren. In: Adam D, Doerr HW, Link H, Lode H, eds. *Die Infektiologie*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg 2004, pp. 794-799.

Dolei A, Pietropaolo V and Gomes E et al., Polyomavirus persistence in lymphocytes: prevalence in lymphocytes from blood donors and healthy personnel of a blood transfusion centre. *J Gen Virol* 2000; 81: 1967-1973.

Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Wali R, Cubitt CC, Ramos E. BK polyoma virus allograft nephropathy: ultrastructural features from viral cell entry to lysis. *Am J Transplant* 2003

Fishman JA. BK nephropathie: What is the role of antiviral therapy? *Am J Transplant* 2003; 3: 99-100.

Fishman JA. BK virus nephropathy-polyomavirus adding insult to injury. *N Engl J Med* 2002; 347: 527-530.

Frisque RJ, Bream GL, Cannella MT. Human polyomavirus JC virus genome. *J Virol* 1984; 51: 458-469.

Gardner SD, Field AM, Coleman DV, Hulme B. New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet* 1971; 1: 1253-1257.

Gardner SD. Prevalence in England of antibody to human polyomavirus (BK). *BMJ* 1973; 1: 77.

Geetha D, Tong BC, Racusen L, et al. Bladder carcinoma in a transplant recipient: evidence to implicate the BK human polyomavirus as a causal transforming agent. *Transplantation* 2002; 73:1933-1936.

Ginevri F, De Santis R, Comoli P, 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: 1266-1270.

Goudsmit J, Wertheim-van Dillen P, van Strien A, van der Noordaa J. The role of BK virus in acute respiratory tract disease and the presence of BKV DNA in tonsils. *J Med Virol* 1982; 10: 91-99.

Gross L. A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 1953; 83: 414-421.

Guo Z, Liu Q, Smith LM. Enhanced discrimination of single nucleotide polymorphisms by artificial mismatch hybridization. *Nature Biotech* 1997; 4: 331-335.

Hirsch HH, Brennan DC, Drachenberg CB, Ginevri F, Gordon J, Limaye AP, Mihatsch MJ, Nickleit V, Ramos E, Randhawa P, Shapiro R, Steiger J, Suthanthiran M, Trofe J. Polyomavirus-Associated Nephropathy in Renal Transplantation: Interdisciplinary Analyses and Recommendations. *Transplantation* 2005; 79(10): 1277-1286.

Hirsch HH, Dickenmann M, Binggeli S, Steiger J. Alte Viren – neue Immunsuppressiva: liaison dangereuse? *Schweiz Med Forum* 2004; 4: 538-541.

Hirsch HH, Knowles W, Dickenmann M, et al. Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients. *N Engl J Med* 2002; 347: 488-496.

Hirsch HH and Steiger J. Polyomavirus BK. *Lancet* 2003; 10: 611-623.

Hogan TF, Borden EC, McBain JA, et al. Human polyomavirus infections with JC virus and BK virus in renal transplant patients. *Ann Intern Med* 1980; 92: 373-378.

Houff SA, Major EO, Katz DA, et al. Involvement of JC virus-infected mononuclear cells from the bone marrow and spleen in the pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy. *N Engl J Med* 1988; 318: 301-305.

Howell DN, Smith SR, Butterly DW, et al. Diagnosis and management of BK polyomavirus interstitial nephritis in renal transplant recipients. *Transplantation* 1999; 68: 1279-1288.

Huang SS, Skolasky RL, Dal Pan GJ, et al. Survival prolongation in HIV-associated progressive multifocal leukoencephalopathy treated with alpha-interferon: An observational study. *Neurovirology* 1998; 4: 324-332.

Hurault de Ligny B, Etienne I, Francois A, et al. Polyomavirus-induced acute tubulointerstitial nephritis in renal allograft recipients. *Transplant Proc* 2000; 32: 2760.

Imperiale MJ, Major EO: Polyomaviridae. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, eds. *Fields Virology*. 5<sup>th</sup> ed., Lippincott Williams and Wilkins 2007, pp. 2263-2298.

Jin L, Gibson PE, Booth JC, Clewleys JP. Genomic typing of BK virus in clinical specimens by direct sequencing of polymerase chain reaction products. *J Med Virol* 1993; 41: 11-17.

Jin L, Gibson PE, Knowles WA, Clewleys JP. BK virus antigenic variants: sequence analysis within the capsid VP1 epitope. *J Med Virol*. 1993; 39(1): 50-6.

Jonas TR. Grösse und Populationsverteilung des Hepatitis-C-Virus. Eine nanometrische Anwendung der Gel-Ausschluß-Chromatographie. Inaugural-Dissertation 2004.

Kadambi PV, Josephson MA, Williams J, et al. Treatment of refractory BK virus-associated nephropathy with cidofovir. *Am J Transplant* 2003; 3: 186-191.

Kazory A, Ducloux D, Chalopin JM, et al. The first case of JC virus allograft nephropathy. *Transplantation* 2003; 76: 1653.

Kitamura T, Kunitake T, Guo J, Tominaga T, Kawabe K, Yogo Y, Transmission of the human polyomavirus JC virus occurs both within the family and outside the family. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2359-2363.

Knowles WA. The epidemiology of BK Virus and the occurrence of antigenic and genomic subtypes. In: Khalili K, Stoner GL, eds. *Human polyomaviruses: molecular and clinical perspectives*, Wiley-Liss, New York (2001), pp. 527-559.

Laghi L, Randolph AE, Chauhan DP, et al. JC virus DNA is present in the mucosa of the human colon and in colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 7484-7489.

Landt O. Selection of Hybridization Probes for Real-Time Quantification and Genetic Analysis.

Leventhal B, Soave R, Mouradian J, et al. Renal dysfunction and hyperglycemia in a renal transplant recipient. *Transplant Infect Dis* 1999; 1: 288-294.

Liddington RC, Yan Y, Moulai J, et al. Structure of simian virus 40 at 3.8-Å resolution. *Nature* 1991; 354: 278-294.

LightCycler Operator's Manual Version 3.5, Roche diagnostics, 1999.

Lin PL, Vats AN, Green M. BK virus infection in renal transplant recipients. *Pediatr Transplant* 2001; 5 (6): 398.

Liu CK, Wei G, Atwood WJ. Infection of glial cells by the human polyomavirus JC is mediated by an N-linked glycoprotein containing terminal alpha(2-6)-linked sialic acids. *J Virol* 1998; 72: 4643-4649.

Major EO, Amemiya K, Tornatore CS, Houff SA, Berger JR. Pathogenesis and molecular biology of progressive multifocal leukoencephalopathy, the JC virus-induced demyelinating disease of the human brain. *Clin Microbiol Rev.* 1992; 5(1): 49-73.

Mei-Chin Wen, Chia-Liang Wang, Meilin Wang, Deching Chang et al. Association of JC Virus With Tubulointerstitial Nephritis in a Renal Allograft Recipient. *J Med Virol* 2004; 72: 675-678.

Mengel M, Marwedel M, Radermacher J, et al. Incidence of polyomavirus-nephropathy in renal allografts: influence of modern immunosuppressive drugs. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 1190-1196.

Mertens T, Haller O, Klenk HD. Diagnostik und Therapie von Viruskrankheiten: Leitlinien der Gesellschaft für Virologie. Urban und Fischer Verlag, 2. Auflage 2004.

Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K. Rapid Cycle Real-Time PCR, Methods and Applications. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2001.

Miralles P, Berenguer J, Garcia de Viedma D, et al. Treatment of AIDS-associated progressive multifocal leukoencephalopathy with highly active antiretroviral therapy. AIDS 1998; 12: 2467-2472.

Modrow S, Falke D, Truyen U. Molekulare Virologie, Spektrum Akademischer Verlag, Gustav Fischer, 2. Auflage 2003.

Moens U and Rekvig OP. Molecular biology of bk virus and clinical and basic aspects of BK virus renal infection. In: Khalili K, Stoner GL, eds. Human polyomaviruses: molecular and clinical perspectives. New York: Wiley-Liss; 2001: 215-226.

Monaco MC, Jensen PN, Hou J, et al. Detection of JC virus DNA in human tonsil tissue: Evidence for site of initial viral infection. J Virol 1998; 72: 9918-9923.

Moriyama T, Namba Y, Kyo M, et al. Prevalence and characteristics of biopsy-proven BK virus nephropathy in Japanese renal transplant patients: analysis in protocol, non-episode and episode biopsies. J Am Soc Nephrol 2003; 14: F-PO571.

Mylonakis E, Goes N, Rubin RH, Cosimi AB, Colvin RB, Fishman JA. BK virus in solid organ transplant recipients: an emerging syndrome. Transplantation 2001; 72 (10): 1587.

Nickeleit V, Hirsch HH, Binet IF, et al. Polyomavirus infection of renal allograft recipients: from latent infection to manifest disease. J Am Soc Nephrol 1999; 10: 1080-1089.

Nickeleit V, Hirsch HH, Zeiler M, et al. BK-virus nephropathy in renal transplants-tubular necrosis, MHC-class II expression and rejection in a puzzling game. Nephrol Dial Transplant 2000; 15: 324-332.

Nickeleit V, Klimkait T, Binet IF, et al. Testing for polyomavirus type BK DNA in Plasma to identify renal-allograft recipients with viral nephropathy. N Engl J Med 2000; 342: 1309-1315.

Nickeleit V, Mihatsch MJ. The pathologist's approach to therapeutic decision making in renal transplantation [abstract]. Transplantation 2002; 74: 181.

Padgett BL, Walker DL, Desquitado MM, Kim DU. BK virus and non haemorrhagic cystitis in a child. Lancet 1983; 1: 770.

Padgett BL, Walker DL, ZuRhein GM, et al. Cultivation of a papovaviralike virus from human brain with progressive multifocal leukoencephalopathy. Lancet 1971; 1: 1257-1260.

Peyret N, Seneviratne PA, Allawi HT, Santa Lucia J Jr. Nearest-neighbor thermodynamics and NMR of DNA sequences with internal A:A, C:C, G:G, and T:T mismatches. *Biochemistry* 1999; 38: 3468-3477.

Pietro Paolo V, Di Taranto C and Degener AM et al., Transplacental transmission of human polyomavirus BK. *J Med Virol* 1998; 56: 372-376.

Poduval RD, Kadambi PV, Javaid B, et al. Leflunomide-a potential new therapeutic agent for BK nephropathy. *Am J Transplant* 2003; 3 (suppl 5): 189.

Poduval RD, Meehan SM, Woodle ES, et al. Successful retransplantation after renal allograft lost to polyoma virus interstitial nephritis. *Transplantation* 2002; 73: 1166-1169.

Purighalla R, Shapiro R, McCauley J, et al. BK virus infection in a kidney allograft diagnosed by needle biopsy. *Am J Kidney Dis* 1995; 26: 671-673.

Ramos E, Drachenberg CB, Papadimitriou JC, et al. Clinical course of polyoma virus nephropathy in 67 renal transplant patients. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 2145-2151.

Ramos ER, Drachenberg CB, Papadimitriou JC, et al. Impact of prospective urine cytology on graft function (GF) for earlier diagnosis of polyoma virus nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2003; 13: 378A.

Randhawa P, Baksh F, Aoki N, Tschirhart D and Finkelstein S. JC virus infection in allograft kidneys. *Transplantation* 2001; 71: 1300-1303.

Randhawa P, Demetris AJ. Nephropathie due to polyomavirus type BK. *N Engl J Med* 2000; 342: 1361-1363.

Randhawa P, Finkelstein S, Scantlebury V, et al. Human polyoma virus-associated interstitial nephritis in the allograft kidney. *Transplantation* 1999; 67: 103-109.

Randhawa P, Ho A, Shapiro R et al. Correlates of quantitative measurement of BK polyomavirus (BKV) DNA with clinical course of BKV infection in renal transplant patients. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1176-1180.

Randhawa P, Khaleel-Ur-Rehman K, Swalsky PA, et al. DNA sequencing of viral capsid protein VP-1 region in patients with BK virus interstitial nephritis. *Transplantation* 2002; 73:1090.

Randhawa P, Vats A, Zygmunt D, et al. Quantitation of viral DNA in renal allograft tissue from patients with BK virus nephropathy. *Transplantation* 2002; 74: 485.

Randhawa P, Zygmunt D, Shapiro R, et al. Viral regulatory region sequence variations in kidney tissue obtained from patients with BK virus nephropathy. *Kidney Int* 2003; 64: 743-747.

Rayment I, Baker TS, Caspar DL, Murakami WT. Polyoma virus capsid structure at 22.5 Å resolution. *Nature* 1982; 295: 110-115.

Reploeg MD, Storch GA, Clifford DB. BK virus: a clinical review. *Clin Infect Dis* 2001; 33:191-202.

Rubinstein R, Pare N, Harley EH. Structure and function of the transcriptional control region of nonpassaged BK virus. *J Virol* 1987; 61: 1747-50.

Santa Lucia J Jr, Allawi HAT, Seneviratne PA. Improved nearest-neighbor parameters for predicting DNA duplex stability, *Biochemistry* 1996; 35: 3555-3562.

Shah KV, Daniel R, Warszawski R. High prevalence of antibodies to BK virus, an SV40-related papovavirus, in residents of Maryland. *J Infect Dis* 1973; 128: 784-787.

Shah KV, Human Polyomavirus BKV and renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 754-755.

Smith M. Considerations on a possible viral etiology for B-precursor acute lymphoblastic leukemia of childhood. *J Immunother* 1997; 20:89-100.

Soave R, Marotta M. The impact of BK virus on the renal transplant recipient. *Curr Opin Organ Transplantation* 2001; 8: 290.

Stewart SE, Eddy BE, Borgese NG. Neoplasms in mice inoculated with a tumor agent carried in tissue culture. *J Natl Cancer Inst* 1958; 20: 1223-1243.

Sundsford A, Spein AR, Lucht E, Flaegstad T, Seternes OM, Traavik T. Detection of BK virus DNA in nasopharyngeal aspirates from children with respiratory infections but not in saliva from immunodeficient and immunocompetent adult patients. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1390-94

Taguchi F, Kajioka J, Miyamura T. Prevalence rate and age of acquisition of antibodies against JC virus and BK virus in human sera. *Microbiol Immunol* 1982; 26: 1057-1064.

Tuzuner A, Saxena M, Randhawa PS, et al. Quantitative (TaqMan™) PCR for BK virus and cidofovir therapy: role in management of BKV induced renal allograft dysfunction [abstract 537]. *Am J Transplantation* 2001; 1 (suppl 1):270.

Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop CM, Carstens EB, Estes MK, Lenon SM, Maniloff J, Mayo MA, Mc Geoch DJ, Pringle CR, Wickner RB (Hrsg.): *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* San Diego, London (u.a.) Academic Press, 2000.

Waldman WJ, Knight DA, Lurain NS, et al. Novel mechanism of inhibition of cytomegalovirus by the experimental immunosuppressive agent leflunomide. *Transplantation* 1999; 68: 814-825.

Wetmur JG. In: Meyers RA (ed) *Molecular Biology and Biotechnology* pp 605-608 VCH Publishers Inc., New York, 1995.

Yogo Y, Kitamura T, Sugimoto C, et al. Isolation of a possible archtypal JC virus DNA sequence from nonimmunocompromised individuals. *J Virol* 1990; 64: 3139-3143.

Zambrano A, Kalantari M, Simoneau A, Jensen JL and Villarreal LP, Detection of human polyomaviruses and papillomaviruses in prostatic tissue reveals the prostate as a habitat for multiple viral infections. *Prostate* 2002; 53: 263-276.

## 6 Appendix

### 6.1 Abkürzungsverzeichnis

SI-Einheiten und daraus abgeleitete Einheiten werden nach der üblichen Art abgekürzt. Nukleotide wurden gemäß der internationalen Nomenklatur abgekürzt.

μ	mikro ( $10^{-6}$ )
Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
AIDS	Acute Immunodeficiency Distress Syndrome
aq.	aqua
as	antisense
bp	basenpaare
bzw.	beziehungsweise
CMV	Cytomegalievirus
Cp	Crossing point
d	Tage
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Pyrokohlensäurediethylester
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
ds	doppelsträngig
EBV	Epstein-Barr-Virus
Fa.	Firma
ff.	folgende
FRET	fluorescence resonance energy transfer
ge	Genome
HAART	hoch aktive antiretrovirale Therapie
HIV	Humanes Immunodefizienz-Virus
HLA	Humanes Leukozytenantigen
Ig	Immunglobulin
i.S.	im Serum
i.U.	im Urin

JLU	Justus-Liebig-Universität
Kat.	Katalog
KM	Knochenmark
LC	LightCycler
log	dekadischer Logarithmus
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanometer ( $10^{-9}$ )
Nr.	Nummer
p	piko ( $10^{-12}$ )
PAN	Polyomavirus-assoziierte Nephropathie
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PML	Progressive multifokale Leukoenzephalopathie
p.t.	post transplantationem
Py	Polyoma
rel.	relativ
RNA	Ribonukleinsäure
RR	regulatorische Region
s	sense
s.	siehe
sec.	Sekunde
SD	Standardabweichung
SLE	systemischer Lupus erythematodes
SV40	Simian Virus 40
t- und T-Ag	Tumorantigene
$T_m$	Schmelztemperatur
TF	Transkriptionsfaktoren
TX	Transplantation
U	Umdrehungen
UV	ultraviolett
V	Virus
VP	Virus-Protein
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

## 6.2 Zusammenfassung

Die Reaktivierung des humanpathogenen Polyomavirus BKV wird zunehmend als Ursache für eine Funktionsverschlechterung transplantierter Nieren bis hin zum Transplantatverlust im Rahmen einer PAN erkannt.

Die Nadel-Biopsie des Nierentransplantats ist derzeit noch der genaueste Test zur Diagnose einer PAN. Einem nicht-invasiven Verfahren zur frühzeitigen Diagnostik einer PAN kommt somit eine große klinische Bedeutung zu.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es uns gelungen eine LC-PCR-Methode zu entwickeln, die eine gleichzeitige Amplifikation der BKV- und JCV-DNA und deren Differenzierung aufgrund unterschiedlichen Annealing-Verhaltens der eingesetzten Hybridisierungssonden ermöglicht. Die PCR dient dem quantitativen Nachweis der BKV- und JCV-DNA in Urin- und Serumproben von Nierentransplantat-Empfängern und ist dadurch den bisherigen nicht-invasiven diagnostischen Verfahren zur Erkennung einer BKV-/JCV-Reaktivierung überlegen.

Insgesamt wurden von uns 152 Nierentransplantatempfänger mittels differenzieller real-time-PCR auf BKV- und JCV-DNA in Serum und Urin untersucht. Die Gesamtprävalenz der BKV-DNA in Urin und Serum betrug 81,6% und 10,5%, die der JCV-DNA im Urin 11,2%. Eine JC-Virämie kam nicht vor.

Zur Darstellung von BKV-Reaktivierungskinetiken innerhalb der ersten zwei Jahre p. t. wählten wir 26 Patienten aus den 152 untersuchten aus. Anhand vorliegender Serum-Kreatininwerte der Patienten konnten zugleich mögliche Einflüsse der BKV-Reaktivierungskinetiken auf die Nierentransplantat-Funktion beobachtet werden. Es zeigte sich, dass eine BKV-Reaktivierung in den meisten Fällen bereits innerhalb der ersten drei Monate p. t. beginnt und eine Häufung der maximalen Virurie und Virämie im dritten und vierten Monat p. t. vorliegt. Des Weiteren deuten unsere Verlaufsbeobachtungen darauf hin, dass selbst BKV-Reaktivierungen mit einer geringen Virusausscheidung im Urin Einfluss auf die Nierenfunktion nehmen können und dass der Anteil der Patienten, die einen Funktionsverlust der Nierenfunktion zeigen, unter den BKV-Serum-positiven deutlich höher liegt, als unter den BKV-Serum-negativen. Die Gefahr einer BKV-Positivität im Serum ist unseren Beobachtungen zufolge im Rahmen eines Anstiegs der BK-Virurie um zwei log-Stufen und einer erreichten BK-Virurie  $>10^4$  Ge/ml gegeben.

Aus unseren Untersuchungsergebnissen schließen wir daher, dass eine einmalige BKV-Quantifizierung in Urin und/oder Serum und die Festlegung eines generellen Cut-off-Wertes für die BK-Virurie oder -Virämie zur Diagnose einer PAN nicht sinnvoll ist. Erst eine kinetische Beurteilung der BK-Virurie unter Berücksichtigung der laborchemischen Parameter der Nierenfunktion und ergänzender Quantifizierung der BK-Virämie ermöglicht die frühzeitige Diagnostik einer PAN. Die Screening-Intervalle sollten aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse innerhalb des ersten Jahres p. t. engmaschig gewählt werden.

### 6.3 Abstract

A reactivation of the human pathogenic BK virus is increasingly being seen as the cause of deterioration in kidney function and transplant loss through PAN in transplanted kidneys.

A needle biopsy of kidney transplants is currently the most accurate test for the diagnosis of PAN and a non invasive method for the early diagnosis of PAN would therefore be of significant clinical value.

In this study we developed a LC-PCR method which makes a simultaneous amplification and differentiation of BK and JC virus DNA possible. This is a result of different annealing behaviours of the implemented hybridising probes. The PCR serves as a quantitative measure of BK and JC virus DNA in urine and serum samples of kidney transplant receivers making it more advanced than other non invasive methods of determining BK/JC virus reactivation.

We investigated a total of 152 kidney transplant receivers for BK and JC virus DNA in serum and urine samples with differential real-time PCR. The total prevalence of BK virus DNA in urine and serum was 81.6% and 10.5% respectively, and the prevalence of JC virus DNA in urine was 11.2%. A JC viremia did not occur.

To illustrate the kinetics of BK virus reactivation in the first two years post-transplant, we monitored the serum creatinine levels 26 of the 152 patients. Through this, possible influences of BK virus reactivation kinetics on the transplanted kidney function could also be observed. It was seen that in most cases a BK virus reactivation began within the first three months post-transplant and showed a maximum viremia and viruria in the third and fourth months post-transplant. Furthermore, our observations indicated that even BK virus reactivations with a low urine virus excretion can have an influence on kidney function and the proportion of

patients showing deterioration in kidney function is considerably higher in the BK virus serum positive group than in the BK virus serum negative one. We observed that a higher risk of BK virus serum positivity is given with an increase of BK viruria by two log units and a BK viruria of  $>10^4$  ge/ml.

From our investigation results we therefore conclude that a single BK virus quantification in urine and/or serum and the determination of a general cut off value for BK viruria or viremia for the diagnosis of a PAN is insufficient. Only a kinetic evaluation of the BK viruria together with the laboratory parameters for kidney function and quantification of the BK viremia allow an early diagnosis of PAN. Our findings also show that the screening intervals should be kept short in the first year post-transplant.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen  
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the  
electronic version of the paper.**

## 6.5 Danksagung

Herrn Prof. Dr. rer. nat. W. H. Gerlich danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die ausgezeichneten Möglichkeiten, es zu bearbeiten.

Herrn Dr. med. C. G. Schüttler danke ich für die gute Betreuung, Geduld und Motivationsgabe, sowie die nicht zuletzt ihm zu verdankende äußerst angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor 341.

Ein herzlicher Dank geht an die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Instituts für Medizinische Virologie und insbesondere der diagnostischen Abteilung, die mir während der gesamten (Experimentier-) Zeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

Ein weiterer Dank geht an die Nierentransplantationsambulanz und –station der Medizinischen Klinik II der JLU-Gießen unter der Leitung von Prof. Dr. R. Weimer für die zuverlässige Überlassung der Urin-, und Serumproben, sowie an Frau Prof. K. Dörries vom Institut für Virologie der bayerischen Julius-Maximilians- Universität Würzburg für die freundliche Bereitstellung der JCV- und BKV-Gesamtgenome.

Julia Kyambi danke ich für die hilfsbereite Unterstützung bei der Übersetzung ins Englische.

Diana Kleespies danke ich für ihre wunderbare Freundschaft, immerwährende Motivation und den unermüdlichen Beistand in allen Computerfragen.

Ein besonders großer Dank gilt meiner Familie, die mich stets unterstützt und mir meinen bisherigen Lebensweg ermöglicht hat.