

## Eine verbesserte Strategie für das Monitoring der BKV-spezifischen zellulären Immunität bei Nierentransplantierten\*

Die Reaktivierung des Humanen Polyomavirus 1 bzw. BK-Virus (BKV) nach Nierentransplantation ist ein Hauptrisikofaktor des Transplantatverlustes. Da keine wirksame BKV-spezifische antivirale medikamentöse Therapie verfügbar ist, besteht das Management im engmaschigen Monitoring und bei Nachweis einer Virämie bzw. Virurie in der stufenweisen Anpassung der Immunsuppression, um die Rekonstitution der BKV-spezifischen zellulären Immunität zu ermöglichen.

### Monitoring

Grundlage des BKV-Monitorings sind regelmäßige, zunächst monatliche PCR-Messungen der BKV-DNA in Blutplasma und Urin. Da der Zusammenhang zwischen der BKV-spezifischen T-Zell-Immunität und der BKV-Reaktivierung wie auch der Überwindung einer BKV-Infektion (Clearance) gut belegt ist, ist das Monitoring der BKV-spezifischen Immunität eine wichtige Zusatzmaßnahme. Bisher beruht dieses Monitoring auf dem Nachweis von T-Zellen, die nach BKV-Antigen-Stimulation Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) bilden. Solche Zellen sind aber im peripheren Blut bei immunsupprimierten Patienten (mit Elispot und Durchflusszytometrie) nur in geringer Frequenz nachweisbar. Zudem ist ihre Rolle bei der BKV-Clearance unklar.

Insgesamt hat das IFN $\gamma$ -basierte Monitoring der BKV-spezifischen T-Zell-Immunität zum Verständnis der Rolle verschiedener T-Zell-Subtypen bei immunsupprimierten Patienten nicht wesentlich beigetragen. Neue, alternative Monitoringstrategien erscheinen notwendig.

### Eigener Ansatz

In unserer Studie nutzten wir den Vorteil der multiparametrischen 17-Farben-Durchflusszytometrie, um den Phänotyp und die Funktionalität BKV-

spezifischer T-Zellen zu charakterisieren. Somit verbesserten wir das Monitoring der BKV-spezifischen T-Zell-Immunität und konnten dadurch die Rolle verschiedener Zellpopulationen bei der Kontrolle einer BKV-Infektion besser verstehen.

Um den Einfluss verschiedener Immunsuppressiva auf die Funktion von BKV-spezifischen T-Zellen zu ermitteln, haben wir BKV-spezifische T-Zellen von gesunden Spendern gewonnen und i.v. vermehrt. Dann wurden sie mit therapeutischen Dosen verschiedener Immunsuppressiva behandelt und mit dem kompletten Repertoire immunogener BKV-Antigene stimuliert, um die Reaktionen zu charakterisieren.

### Ergebnisse

Generell zeigte sich, dass Immunsuppressiva die Expression von Aktivierungsmarkern und des Effektormoleküls Granzym B (GzB) weit weniger beeinflussten als die Expression von Effektorzytokinen (IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$ ).

### Einflüsse verschiedener Immunsuppressiva

Die 5 untersuchten Immunsuppressiva beeinflussten die Zytokinsekretion und Expression der Zelloberflächenmarker signifikant unterschiedlich. Prednisolon und Calcineurin-Inhibitoren (CNI) reduzierten die Zytokinsekretion und zytotoxische Kapazität der BKV-spezifischen T-Zellen, während der mTOR-Inhibitor (mTOR-I) Rapamycin und Mycophenolatmofetil (MMF) diesen Effekt nur minimal bis gar nicht aufwiesen.

Tacrolimus und Ciclosporin verringerten die Expression der inflammatorischen Zytokine IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  um >80% und in geringerem Ausmaß auch die Expression von Interleukin 2 (IL2). Die Expression des zytolytischen Markers GzB sowie der Aktivierungsmarker CD137 und CD154 wurde durch die CNI ebenfalls reduziert.

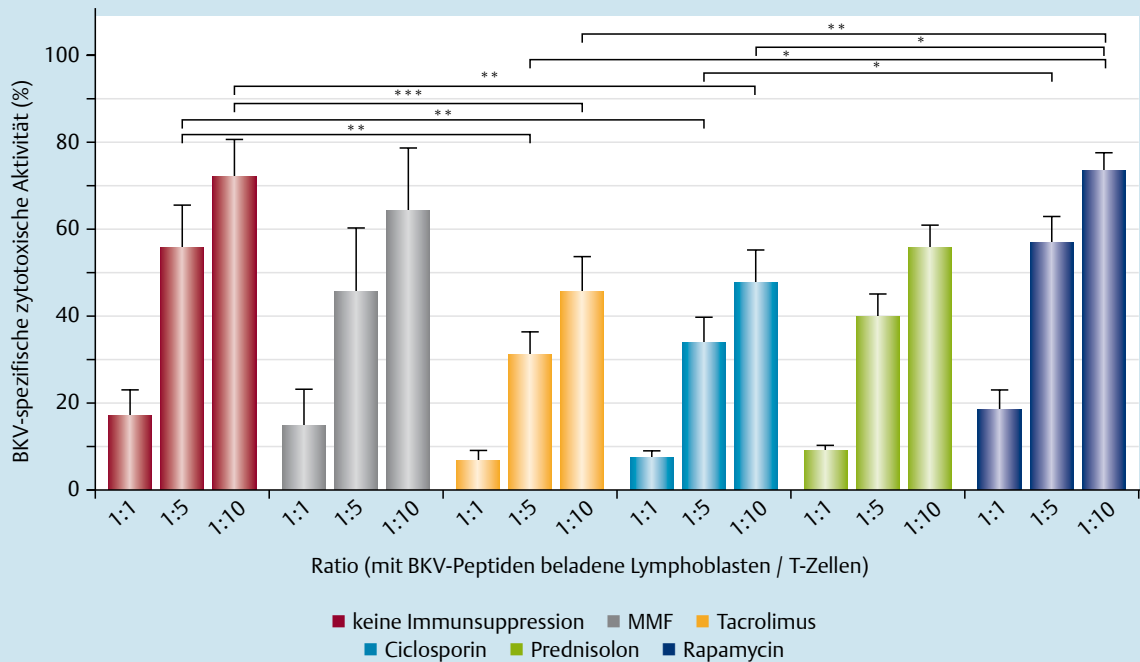


Prednisolon verringerte die TNF $\alpha$ -, die IL2- und in geringerem Ausmaß auch die IFN $\gamma$ -Sekretion, aber weniger als die CNI. Sowohl CNI als auch Prednisolon reduzierten die Zahl der multifunktionalen (TNF $\alpha$ -, IFN $\gamma$ - und IL2-positiven) T-Zellen deutlich. Diese Effekte waren bei CD4+ T-Zellen stärker ausgeprägt als bei CD8+ T-Zellen.

Unter Prednisolon, Tacrolimus oder Ciclosporin ging auch die zytolytische Aktivität BKV-spezifischer T-Zellen signifikant um etwa 30% gegenüber unbehandelten Zellen zurück. Rapamycin und MMF hatten dagegen nur einen minimalen Einfluss auf die Effektor- und zytotoxischen Funktionen der BKV-spezifischen Zellen (Abb. 1). Die Erhaltung der zytotoxischen T-Zell-Funktion unter mTOR-I-Behandlung könnte somit frühere Befunde erklären, die auf eine protektive Rolle von mTOR-I im Hinblick auf die Entwicklung einer BKV-Nephropathie bei Nierentransplantierten hindeuten.

### Detektion BKV-spezifischer T-Zellen unter Immunsuppression

In der Studie wurde erstmalig der Effekt von Immunsuppressiva auf die Expression von CD137 und CD154 gezeigt, die



**Abb. 1** Calcineurin-Inhibitoren und Prednisolon, aber nicht MMF und mTOR-Inhibitoren reduzieren die zytotoxische Aktivität BKV-spezifischer T-Zellen gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe signifikant; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

als antigenspezifische Aktivierungsmarker gelten. CNi und Prednisolon reduzierten zwar die Expression dieser Marker, aber deutlich weniger als die Zytokin-Expression. Da diese Aktivierungsmarker durch die Immunsuppression wenig beeinflusst werden, sind sie zum Nachweis BKV-spezifischer Zellen bei immunsupprimierten Patienten besser geeignet als das bis jetzt eingesetzte IFN $\gamma$ .

Bisher werden diese Zellen anhand der Expression von IFN $\gamma$  identifiziert, das jedoch durch Immunsuppressiva stark beeinflusst wird. Hier werden BKV-spezifische CD4+-T-Helferzellen durch Koexpression von CD137 und CD154 sowie zytotoxische CD4+- und CD8+-T-Zellen durch Expression von CD137 und GzB nachgewiesen.

Diese Neudefinition ergab deutlich höhere Nachweiszahlen für BKV-spezifische T-Zellen mit einem mittleren Anstieg auf das 4,2-Fache gegenüber IFN $\gamma$ -basierten Nachweisstrategien. Die neuen Kategorien umfassten alle BKV-spezifischen IFN $\gamma$ -bildenden und multifunktionellen CD4+-T-Helferzellen.

Der neue Ansatz verbessert somit die Sensitivität des Nachweises BKV-spezifischer Immunzellen unter Immunsuppression gegenüber der herkömmlichen IFN $\gamma$ -basierten Methodik signifikant. Vermutlich wurde bisher die zytotoxische Kapazität BKV-spezifischer T-Zellen (auch in vivo) substanziiell unterschätzt.

#### Funktionalität der BKV-spezifischen T-Zellen

CD4+-T-Zellen tragen zur BKV-Clearance durch ihre Helferfunktion und als zytolytische Effektorzellen bei. Im CD4+-T-Zell-Kompartiment war sowohl während als auch nach der BKV-Clearance-Phase ein signifikanter Anstieg gegenüber den Ausgangswerten vor der Clearance-Phase zu verzeichnen (siehe unten). Während der Clearance stiegen auch die zytotoxischen CD4+-T-Zellen deutlich an. Dagegen gab es im zytotoxischen CD8+-T-Zell-Kompartiment vor, während oder nach der Clearance keine signifikante Veränderung.

Während der Clearance kam es außerdem zu einem Anstieg der IFN $\gamma$ - und der TNF $\alpha$ -bildenden CD4+-T-Helferzellen.

Die insgesamt seltenen IL2-bildenden Zellen stiegen nach der Virusclearance deutlich an. Die Häufigkeit der Zytokinbildenden CD8+-T-Zellen veränderte sich mit Bezug zur BKV-Clearance nicht signifikant.

#### BKV-spezifische T-Zellen während der BKV-Reaktivierung

Um die Rolle der BKV-spezifischen T-Zellen für die BKV-Clearance zu evaluieren, wurde die BKV-T-Zell-Immunität bei gesunden BKV-seropositiven Blutspendern und BKV-seropositiven nierentransplantierten Patienten ohne und mit BKV-Reaktivierung untersucht. Während keine Unterschiede in der Häufigkeit BKV-spezifischer T-Zellen zwischen Gesunden und nierentransplantierten Patienten ohne BKV-Reaktivierung ersichtlich waren, zeigten Patienten mit BKV-Reaktivierung signifikant niedrigere Frequenzen BKV-spezifischer T-Zellen vor der Phase der Virus-Clearance. Während der Clearance stieg dann die Häufigkeit der zytolytischen CD4+-T-Zellen auf ähnliche Werte wie bei Gesunden und ging nach der Clearance wieder leicht zurück.



## Interview mit Frau Professor Dr. med. Nina Babel

Univ.-Prof. Dr. Nina Babel, Leiterin des Centrums für Translationale Medizin mit Schwerpunkt Transplantation und Immunologie, Marien Hospital Herne, Universitätsklinikum Ruhr-Universität Bochum und Berlin-Brandenburger Center für Regenerative Therapie und Institut für Medizinische Immunologie, Charité Universitätsmedizin Berlin

**Der letzte Satz Ihres Artikels\* lautet: „Diese Ergebnisse können wichtige Implikationen für das Management nierentransplantiertes Patienten mit BKV-Reaktivierung haben.“ Können Sie das bitte kurz erläutern?**

Bis jetzt existiert keine antivirale Therapie gegen BKV-Reaktivierungen. Aus den Studien weiß man nur, dass man versuchen sollte, die Immunsuppression so zu modulieren, dass das Immunsystem am besten in der Lage ist, gegen das Virus anzugehen. Dazu gibt es verschiedene Modalitäten. Man kann Immunsuppressiva wie Calcineurininhibitoren oder MMF reduzieren oder absetzen, von Tacrolimus auf Ciclosporin umstellen oder die Immunsuppression auf einen mTOR-

Inhibitor umstellen. Da es dazu keine prospektive Studie gibt, geht jedes Zentrum nach der eigenen Erfahrung vor. Diese beruht auf den Fällen, die das Zentrum bereits therapiert hat.

**Welche Eigenschaften sollten immunsuppressive Therapien im Hinblick auf BKV-Reaktivierungen haben? Wie würden Sie mTOR-Inhibitoren diesbezüglich beurteilen?**

Vorliegende, meist retrospektive Studien zeigten, dass Patienten unter mTOR-Inhibitor-Therapie weniger BKV-Infektionen haben. Unsere In-vitro-Studien geben einen klaren Hinweis darauf, dass Patienten unter mTOR-Inhibitor-Therapie von der Rekonstitution der Immunzellen zur Bekämpfung der BKV-Infektion deutlich profitieren. mTOR-Inhibitoren sind offenbar die derzeit optimale immunsuppressive Therapie im Hinblick auf die BKV-Bekämpfung.

**Gibt es bereits Zentren oder Studien, in denen Ihre BKV-Monitoringstrategie angewendet wird? Wie ist das weitere Vorgehen geplant?**

Demnach dürften BKV-spezifische CD4+-T-Helferzellen (und möglicherweise auch multifunktionelle CD4+-T-Zellen) eine protektive Funktion gegenüber der BKV-Reaktivierung haben. Die Rolle von CD8+-T-Zellen bei der BKV-Clearance bleibt unklar; der erhöhte Wert bei dem Patienten mit BKV-Nephropathie unterstützt die Hypothese, dass es sich um eine BKV-assoziierte Immunpathogenese handeln könnte.

### Fazit

Die Resultate dieser Studie schaffen die Grundlage für eine verbesserte Nachweisstrategie BKV-spezifischer T-Zellen bei nierentransplantierten Patienten. Sie bringen auch klare Hinweise auf den Beitrag dieser Zellen zur Clearance einer BKV-Infektion. Die aufgezeigte Strategie ist robuster und sensitiver als die Zytokin-basierte

Wir haben im klinischen Alltag schon begonnen, unsere Patienten mit erhöhtem BKV-Risiko mit mTOR-Inhibitoren zu therapieren und die Ergebnisse zu erfassen. Da die Fallzahlen in einem Zentrum nicht besonders hoch sind, wollen wir mit anderen Zentren zusammenarbeiten. Daraus wollen wir dann eine multizentrische, prospektive Studie entwickeln. Darin wollen wir unsere Monitoringstrategie prospektiv bei de novo transplantierten Patienten mit dem Risiko einer BKV-Reaktivierung einsetzen, die wir von Anfang an auf eine mTOR-Inhibitor-basierte Immunsuppression einstellen werden.

Derzeit untersuchen wir auf unterschiedlichen Regulationsebenen (Genexpression, Epigenetik, Proteine, Zellpopulation sowie Organfunktion), wie sich das BKV-Risikoprofil eines Patienten zusammensetzt. Dieses Wissen wird uns dabei helfen, tatsächlich die Risikopersonen für BKV zu identifizieren, die auf eine mTOR-Inhibitor-basierte Therapie eingestellt werden sollen.

**Herzlichen Dank für das Gespräch.**

Standardmethode und daher besser geeignet, die BKV-spezifische Immunität bei Nierentransplantierten unter Immunsuppression in der Praxis zu monitorieren. Die neue Strategie zeigt, dass mTOR-Inhibitoren die Effektor- und zytotoxischen Funktionen der BKV-spezifischen T-Zellen kaum beeinflussen, und demonstriert zugleich die wichtige protektive Rolle der zytotoxischen CD4+-T-Zellen und der CD4+-T-Helferzellen bei der Clearance einer BKV-Reaktivierung.

\* nach Weist BJ, Wehler P, El Ahmad L, Schmuck-Hennesse M, Millward JM, Nienen M, Neumann AU, Reinke P, Babel N. A revised strategy for monitoring BKV-specific cellular immunity in kidney transplant patients. *Kidney Int* 2015; 88: 1293–1303

Dagegen zeigten die Häufigkeiten der BKV-spezifischen zytotoxischen CD8+-T-Zellen bei Gesunden und Transplantierten (mit oder ohne BKV-Reaktivierung) keine signifikanten Veränderungen.

Vor der BKV-Clearance waren multifunktionelle (TNF $\alpha$ -, IFN $\gamma$ - und IL2-bildende) CD4+-T-Zellen kaum nachweisbar, nach der Clearance wurden sie in geringem Ausmaß detektiert.

Ein Nierentransplantiertes, der seine BKV-Infektion nicht überwinden konnte und sein Transplantat durch eine BKV-Nephropathie verlor, hatte nur vereinzelte BKV-spezifische zytotoxische CD4+-T-Zellen und CD4+-T-Helferzellen, jedoch eine weit höhere Frequenz von zytotoxischen CD8+-T-Zellen als Patienten mit erfolgreicher BKV-Clearance.