

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und
Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin IV
(Schwerpunkt: Endokrinologie und Diabetologie, Angiologie,
Nephrologie und klinische Chemie)
Sektion Nieren- und Hochdruckkrankheiten

**Low-dose Cidofovir und Umstellung auf mTOR-basierte
Immunsuppression bei Polyomavirus-assoziiertes
Nephropathie (PVAN)**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Mühlbacher, Thomas

2018

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. N. Heyne

2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. R. Ladurner

Tag der Disputation: 11.10.2018

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung	8
1.1 Polyomaviren	8
1.2 Epidemiologie und Pathogenese von BKV	10
1.3 Polyomavirus assoziierte Nephropathie - PVAN	11
1.4 Immunsuppression und PVAN	15
1.5 Cidofovir	17
1.6 Alternative therapeutische Optionen	20
1.7 Fragestellung und Hypothese	22
2 Material und Methoden.....	23
2.1 Patienten	23
2.2 Ethik	23
2.3 Material	23
2.4 Tübinger Cidofovir-Protokoll.....	24
2.5 Umstellung der Immunsuppression.....	25
2.6 Statistische Auswertung	25
3 Ergebnisse	26
3.1 Baseline-Charakteristika	26
3.2 Therapeutische Interventionen.....	28
3.2.1 Cidofovir	28
3.2.2 mTOR-Inhibitor	29
3.2.3 Begleittherapie.....	30
3.3 Exemplarische Darstellung eines Verlaufs unter therapeutischer Intervention.....	31

3.4	Outcome BK-Virämie.....	33
3.5	Vergleich von Patienten mit und ohne Virusclearance	34
3.6	Outcome Transplantatfunktion	36
4	Diskussion.....	39
4.1	Therapeutische Interventionen.....	39
4.2	Evaluation Therapieerfolg	44
5	Schlussfolgerung.....	48
6	Zusammenfassung.....	49
7	Literaturverzeichnis	51
8	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift.....	58

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1	Genom des BK-Virus
Abbildung 2	Histologische Aufarbeitung einer Nierenbiopsie
Abbildung 3	Immunhistochemische Aufarbeitung einer Nierenbiopsie
Abbildung 4	Zelluläre Mechanismen der Immunsuppression auf BKV Replikation
Abbildung 5	Renaler Transport von Cidofovir
Abbildung 6	Tübingen Cidofovir-Protokoll
Abbildung 7	Exemplarischer Verlauf unter therapeutischer Intervention
Abbildung 8	Kumulative BKV-Clearance aller 19 Patienten
Abbildung 9	Kopienzahl BKV-PCR zum Diagnosezeitpunkt bei Patienten ohne und mit Virusclearance
Abbildung 10	eGFR MDRD zum Zeitpunkt Cidofovir Applikation bei Patienten ohne und mit Virusclearance
Abbildung 11	Outcome Transplantatnierenfunktion gemessen an der eGFR
Abbildung 12	Transplantatverlust bedingt durch PVAN und aufgrund anderer Ursachen ab dem Zeitpunkt der histologischen Diagnosestellung

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

BKV	BK-Virus
CD	Cluster of determination
Cid	Cidofovir
CMV	Zytomegalie Virus
CsA	Ciclosporin A
DNA	desoxyribonucleic acid
DSA	donor-spezifische Antikörper
dsDNA	doublestranded desoxyribonucleic acid
eGFR	errechnete Glomeruläre Filtrationsrate
HIV	Humanes Immunodefizienz Virus
HLA	Human leukocyte antigen
hOAT1	humaner renaler organischer Anionentransporter 1
HSV	Herpes simplex Virus
IgG	Immunglobulin G
IL2	Interleukin 2
IQR	interquartile range
Ivlg	Intravenöse Immunglobuline
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LTA	large t antigen
MDRD	Modification of diet in renal disease
mg	Milligramm
MMF	Mycophenolat-Mofetil

MPS	Mycophenolsäure
mTOR	mammalian target of rapamycin
NCCR	noncoding control region
PVAN	Polyomavirus-assoziierte Nephropathie
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
Rb	Retinoblastom
St	small tumor
SV40	simian polyomavirus 40
Tx	Transplantation
VP	virales Protein

1 EINLEITUNG

1.1 POLYOMAVIREN

Polyomaviren wurden erstmals im Jahr 1953 von dem polnisch-amerikanischen Virologen Ludwig Gross unter dem Begriff „murine leukemia viruses“ beschrieben und identifiziert. Damals wurden neugeborenen Mäusen zellfreie Extrakte mit „murine leukemia“ injiziert, woraufhin diese Adenokarzinome der Parotis und Leukämien entwickelt hatten. Daraus wurde geschlussfolgert, dass es sich hierbei um eine übertragbare Genese für Malignome handelt (Gross, 1953). Die Bezeichnung Polyomavirus entstammte demzufolge den griechischen Wörtern für viele (poly) und Krebs (oma) (Stewart et al., 1957). Bisweilen sind etwa dreißig Spezies von Polyomaviren identifiziert, wobei lediglich dreizehn im Menschen isoliert werden konnten (Gerits and Moens, 2012). Die Spezies der BK Polyomaviren wurde erstmals 1971 aus dem Urin eines nierentransplantierten Patienten von der Virologin Sylvia Gardner isoliert und nach den Initialen dieses Patienten benannt (Gardner et al., 1971). In den nächsten Jahren waren keine weiteren Fälle von BK-Virus Infektionen beschrieben worden, bis ab dem Jahr 1995 vermehrt Berichte über BKV von diversen Transplantationszentren publiziert wurden (Purighalla et al., 1995, Mathur et al., 1997, Randhawa et al., 1999). Ob die zur Namensgebung führende Überlegung, dass Polyomaviren kanzerogen sind, richtig ist, ist nicht gänzlich geklärt. Bei immunkompetenten Patienten konnte BK-Virus-DNA bei Blasen- und Urothelkarzinomen nachgewiesen werden, jedoch bisher ohne klar nachweislichen kausalen Zusammenhang (Rollison et al., 2007).

Das BK-Virus ist ein 40-45 nm großes, ikosaedrisches, nicht umhülltes dsDNA-Virus. Die Viren können Temperaturen von 50°C für 30 Minuten tolerieren.

Jedes BK Virus Genom ist in drei Regionen angeordnet (siehe Abbildung 1) (Shah):

- Eine „noncoding control region“ (NCCR)
- Eine früh codierende Region welche das „small t antigen“ (st-ag) und das „large t antigen“ (LT-ag oder LTA)
- Eine spät codierende Region für virale Kapsid-Proteine (VP1, VP2 und VP3) und Agnoprotein

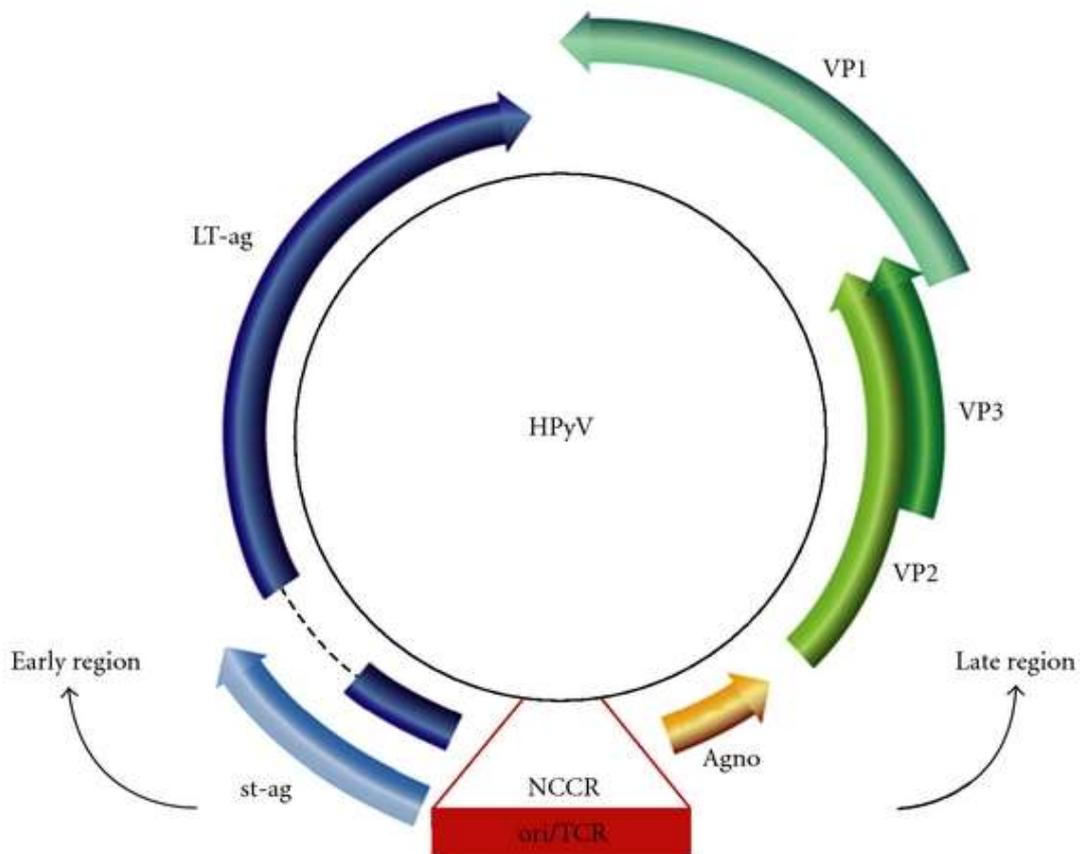


Abbildung 1: Genom des BK-Virus

aus Moens U (2011) Human Polyomaviruses in Skin Diseases. Pathology Research International (Moens et al., 2011)

Die NCCR ist Ursprung der Replikation und beinhaltet regulatorische Elemente, welche die virale Transkription aktivieren. Das LTA fördert die virale Replikation, indem eine Bindung an die Tumorsuppressor-Proteine Rb (Retinoblastom) und

p53 erfolgen (Eckner et al., 1996, Gomez-Lorenzo et al., 2003, Roy et al., 2003, Valls et al., 2003). Die viralen Proteine VP 1-3 werden für die Zusammenstellung des vollständigen Virons benötigt. Das Genom des BK-Virus besitzt eine hohe Ähnlichkeit mit den beiden ebenso beim Menschen vorkommenden JC-Virus (72% Nukleotid-Homologie) und SV40 (70% Nukleotid-Homologie).

Vom BK-Virus (BKV) werden vier serologisch unterschiedliche Subtypen mit unterschiedlicher Prävalenz und geographischer Häufung unterschieden. Der BKV Subtyp I ist weltweit am häufigsten nachweislich und wird nochmals in vier Subtypen unterteilt (Ia, Ib-1, Ib-2 und Ic). Der Subtyp IV findet sich etwas seltener, jedoch gehäuft in Südostasien, wohingegen die Subtypen II und III deutlich seltener isoliert werden können, mit regionaler Häufung in Afrika (Takasaka et al., 2004, Chen et al., 2006, Krumbholz et al., 2006, Zhong et al., 2007)

1.2 EPIDEMIOLOGIE UND PATHOGENESE VON BKV

BKV- und JCV-Infektion sind häufige Infektionen in der Allgemeinbevölkerung (Egli et al., 2009a). Betrachtet man die Klinik der Primärinfektion, verläuft diese meist asymptomatisch oder ist gekennzeichnet durch milde respiratorische Symptome. Man geht davon aus, dass die primäre Infektion durch das BK-Virus typischerweise in der ersten Lebensdekade stattfindet. Dies bestätigt sich in der hohen Seroprävalenz für BKV mit dem Maximalwert von 91% zwischen dem 5. und 9. Lebensjahr (Knowles et al., 2003). Eine Untersuchung an gesunden Blutspendern aus der Schweiz zwischen 20 und 59 Jahren erbrachte eine Seroprävalenz für BKV Immunglobulin G (IgG) von 82 % (Egli et al., 2009a).

Der Übertragungsweg des BK-Virus konnte bis zum heutigen Tag nicht sicher geklärt werden. Es wird heute von einer Tröpfcheninfektion oder oralen Infektion ausgegangen. Dies wird bestärkt durch die Tatsache, dass BK-Viren in Tonsillengewebe detektiert werden konnten (Goudsmit et al., 1982).

Nach der Infektion und Expression des „small t antigen“ und „large t antigen“ beginnt die Replikation in empfänglichen Wirtszellen. Das BK-Virus führt zu einer Reihe von morphologischen Veränderungen, welche gleichzeitig mit der Aufnahme des LTA in den Nukleus stattfinden. Daraufhin entwickeln sich durch die Zusammenstellung des Kapsids intranukleäre Einschlusskörper. Infolgedessen vergrößern sich diese Zellen, nehmen eine runde Form an und lösen sich von der Basalmembran bzw. benachbarten Zellen und können durch Zellyse infektiöse Nachkommen freisetzen (Imperiale MJ, 2007).

Der Replikationszyklus für BK-Viren ist wahrscheinlich abhängig von der Wirtszelle und beträgt bei Tubulusepithelzellen in-vitro und in-vivo 48 bis 72 Stunden (Funk et al., 2008). Nach der erfolgten Primärinfektion von Polyomaviren an Schleimhautoberflächen verteilt sich das Virus auf andere Gewebe und Organe, für das BK-Virus betrifft dies vor allem den urogenitalen Trakt (Chesters et al., 1983). Anschließend kommt es zu einer Latenz des Virus im Tubulusepithel und in B-Lymphozyten (Shah, 2000). Obwohl relevante klinische Manifestationen bei immunkompetenten Menschen selten sind, lässt sich auch bei immunkompetenten Wirten teilweise in niedriger Konzentration eine Virurie als Zeichen einer aktiven Virusreplikation mit BKV nachweisen (Drachenberg et al., 2007). Durch eine Immunsuppression steigt die Prävalenz der Virurie im Vergleich zur immunkompetenten Wirten (60-80% vs. 10%) (Bressollette-Bodin et al., 2005, Nickleit et al., 2000b). Eine aktive Erkrankung, gekennzeichnet durch eine hohe Virurie oder gar Virämie, tritt jedoch fast ausschließlich nach Nieren- oder Stammzelltransplantation auf. Die beschriebenen Krankheitsmanifestationen durch BKV beinhalten die Polyomavirus-assoziierte Nephropathie (PVAN), eine Ureterstenose und eine hämorrhagische Zystitis.

1.3 POLYOMAVIRUS ASSOZIIERTE NEPHROPATHIE - PVAN

Die Erstbeschreibung der Polyomavirusnephropathie erfolgte 1978 durch Mackenzie (Mackenzie et al., 1978). In den darauffolgenden Jahren finden sich

in der Literatur kaum mehr Berichte zur PVAN. Eine Infektion mit BK-Polyomavirus ist die häufigste Virusinfektion des Nierentransplantates und häufigste viral bedingte Ursache für eine Transplantatfunktionsverschlechterung bzw. ein Transplantatversagen (Nickeleit et al., 1999, Nickeleit et al., 2000a). Die Prävalenz einer Polyomavirus-assoziierten Nephropathie (PVAN) liegt zwischen 1-10% bei nierentransplantierten Patienten (Hirsch et al., 2002, Dharnidharka et al., 2009). Die Erkrankung tritt am häufigsten in den ersten beiden Jahren nach Transplantation auf, kann jedoch auch viele Jahre nach Transplantation auftreten (Nickeleit et al., 2003). Obwohl das medizinische Bewusstsein für die Erkrankung gestiegen ist, die diagnostischen Möglichkeiten sich verbessert haben und das grundsätzliche Therapiekonzept der Reduktion der Immunsuppression weit verbreitet und anerkannt ist, konnte man nur wenig Verbesserungen hinsichtlich des Transplantatüberlebens bei BK-Virus Nephropathie erreichen. Dies spiegelt sich in der unverändert hohen Rate an Transplantatverlusten von über 40 % wieder (Hirsch et al., 2005).

Der wichtigste Risikofaktor für die Entwicklung einer PVAN ist das Ausmaß der Immunsuppression, wohingegen keine eindeutig signifikante Assoziation einer spezifischen immunsuppressiven Therapie mit der Entwicklung einer PVAN aufgezeigt werden konnte (Gardner et al., 1984, Nickeleit et al., 2000b, Hirsch et al., 2005, Schold et al., 2009, Mengel et al., 2003). In den siebziger Jahren wurde die Immunsuppression mit Ciclosporin und Azathioprin durchgeführt. In den späten neunziger Jahren erfolgte die Einführung neuer Immunsuppressiver Medikamente mit daraufhin folgender Verbesserung des Transplantatüberlebens in der Frühphase nach Transplantation. Coinzident damit vermehrten sich die Berichte für die Entwicklung von PVAN an verschiedenen Transplantationszentren (Buehrig et al., 2003). Sonstige Risikofaktoren für die PVAN sind unter anderem „HLA-Mismatches“, ABO-Inkompatibilität, frühere Abstoßungen, Empfängeralter, BKV-Seronegativität vor Transplantation und ein vorbestehender Diabetes mellitus (Bohl et al., 2005).

Die Diagnose der Polyomavirus-assoziierten Nephropathie wird histologisch durch eine Nierenbiopsie gestellt. Prinzipiell sollte bei jedem unklaren Kreatininanstieg nach Nierentransplantation, insbesondere in den ersten zwei

Jahren nach Transplantation, an eine PVAN gedacht werden. Sonstige klinische Beschwerden treten typischerweise nicht auf. Hinweise für die Entwicklung einer PVAN, welche im Verlauf zur Durchführung der Nierenbiopsie führen sollten, können durch Urindiagnostik und quantitative „polymerase chain reaction“ (qPCR) gefunden werden. Eine Urinzytologie kann BK-Virus infizierte Zellen darstellen. Diese zeigen typischerweise einen vergrößerten Zellkern, bedingt durch die hohe Menge an neu formierten Vironen und werden als „decoy cells“ bezeichnet. Ein Nachweis von „decoy cells“ im Urin oder ein positiver qPCR Nachweis von BKV im Urin erfolgt in 20-60% der nierentransplantierten Patienten und geht häufig einer Virämie voraus (Hirsch et al., 2002, Ramos et al., 2002). Die Zytologie mit Nachweis von „decoy cells“ ist charakteristisch, jedoch nicht pathognomonisch für die PVAN. Die qPCR für BKV im Serum oder Plasma ist mit einer Sensitivität und Spezifität von 100 bzw. 88% ein deutlich besserer Parameter (Hirsch et al., 2002, KDIGO, 2009). Dies spiegelt sich auch in der Empfehlung der KDIGO Leitlinie wider, nierentransplantierte Patienten zum Screening auf BKV mittels qPCR im Plasma für die ersten 3-6 Monate nach Transplantation monatlich zu untersuchen und anschließend alle 3 Monate bis zum Ende des ersten Jahres nach Transplantation (KDIGO, 2009). Wie bereits angesprochen, wird die Diagnose der PVAN jedoch histologisch mittels Nierenbiopsie gesichert. Die histologische Aufarbeitung zeigt charakteristische zytopathologische Veränderungen des Tubulusepithels, vergesellschaftet mit einer positiven Reaktion eines monoklonalen Antikörpers gegen das LT Antigen von SV40 (siehe Abbildung 2 und 3). Anhand dieser Veränderungen wird die Schwere des Gewebeschadens histologisch graduiert, um eine prognostische Einschätzung zu tätigen.

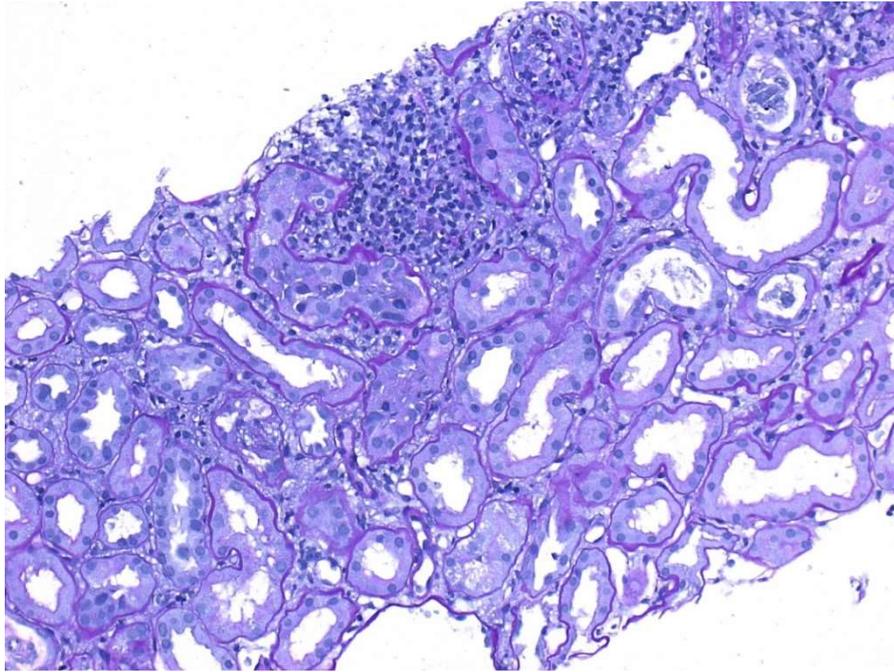


Abbildung 2: Histologische Aufarbeitung einer Nierenbiopsie (PAS Färbung, 20-fache Vergrößerung). Typische zytopathologische Veränderung im Sinne einer Tubulitis mit lymphoplasmazellulärer Infiltration (Bilder bereitgestellt durch Prof. Dr. Amann, Erlangen)

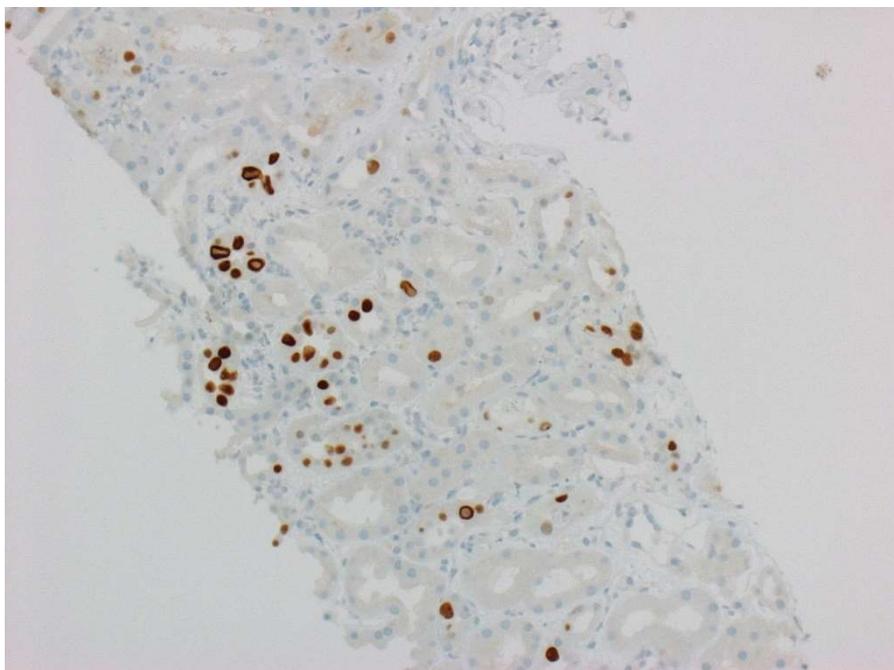


Abbildung 3: Immunhistochemische Aufarbeitung einer Nierenbiopsie (20-fache Vergrößerung) Pathognomonische Positivität der infizierten Tubuluszellkerne in der SV-40 Färbung (Bilder bereitgestellt durch Prof. Dr. Amann, Erlangen)

Die histopathologische Einteilung sieht wie folgt aus:

- Das PVAN-A Muster zeigt milde bis moderate zytopathologische Veränderungen (< 25%) mit minimaler interstitieller Entzündung, Fibrose und Tubuluaratrophie (< 10%)
- Das PVAN-B Muster zeigt moderate (11-25%) bis extensive (26% - 100%) zytopathologische Veränderungen und wird anhand der Schwere der interstitiellen Entzündung in PVAN-B1 (11-25%), PVAN-B2 (26-50%) und PVAN-B3 (>50%) weiter klassifiziert
- Das PVAN-C Muster ist gekennzeichnet durch eine schwere interstitielle Fibrose und Tubulusatrophie mit unterschiedlichem Ausmaß an interstitieller Inflammation und milden bis moderaten zytopathologischen Veränderungen (Hirsch et al., 2009)

Das Risiko eines Transplantatversagens steigt mit der Schwere des histologischen Befalls von PVAN-A (12,9%), über PVAN-B1 (40%), PVAN-B2 (56%), PVAN-B3 (77,7%) und PVAN-C (100%) (Hirsch et al., 2009, Drachenberg et al., 2004).

1.4 IMMUNSUPPRESSION UND PVAN

Die kumulative Immunsuppression ist als wichtigster Risikofaktor für die Reaktivierung der BK-Viren und das Auftreten einer PVAN einzustufen. Der Einfluss der unterschiedlichen immunsuppressiven Medikamente wird demgegenüber nachrangig eingestuft. Demzufolge ist es nicht verwunderlich, dass die bisher einzige etablierte Therapie für die PVAN in der Reduktion der Immunsuppression besteht.

Betrachtet man die verschiedenen immunsuppressiven Medikamente, gibt es Hinweise darauf, dass es unter Tacrolimus zu einer höheren Virurie und Virämie verglichen mit Cyclosporin A oder mTOR-Inhibitoren kommt. Dies beruht auf verschiedenen Mechanismen. Unter anderem wurden im Rahmen einer wissenschaftlichen Arbeit die Effekte von verschiedenen Immunsuppressiva auf die BKV-Replikation in primären menschlichen

Tubulusepithelzellen untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass unter dem mTOR-Inhibitor Sirolimus eine 90%ige Inhibition der Replikation von BKV erzielt werden konnte, wohingegen Tacrolimus die BKV Replikation verstärkte und der inhibitorische Effekt von Sirolimus durch Tacrolimus aufgehoben werden konnte. Ein zentrales Protein für diesen Effekt scheint FKBP-12 zu sein. Sowohl Tacrolimus als auch Sirolimus können an FKBP-12 binden. Durch Knockout von FKBP-12 konnte der inhibitorische Effekt von Sirolimus, aufgehoben werden. In dieser Arbeit wird davon ausgegangen, dass FKBP-12 als eine Art „Handbremse“ für die BKV Replikation fungiert und dass dieser Effekt durch Tacrolimus aufgehoben werden kann (siehe Abbildung 4). Interessanterweise führte der Calcineurininhibitor (CNI) Ciclosporin A in dieser Untersuchung ebenso wie Sirolimus zu einer Inhibition der BKV Replikation. Somit ist von keinem Klasseneffekt der CNI auszugehen (Hirsch et al., 2016).

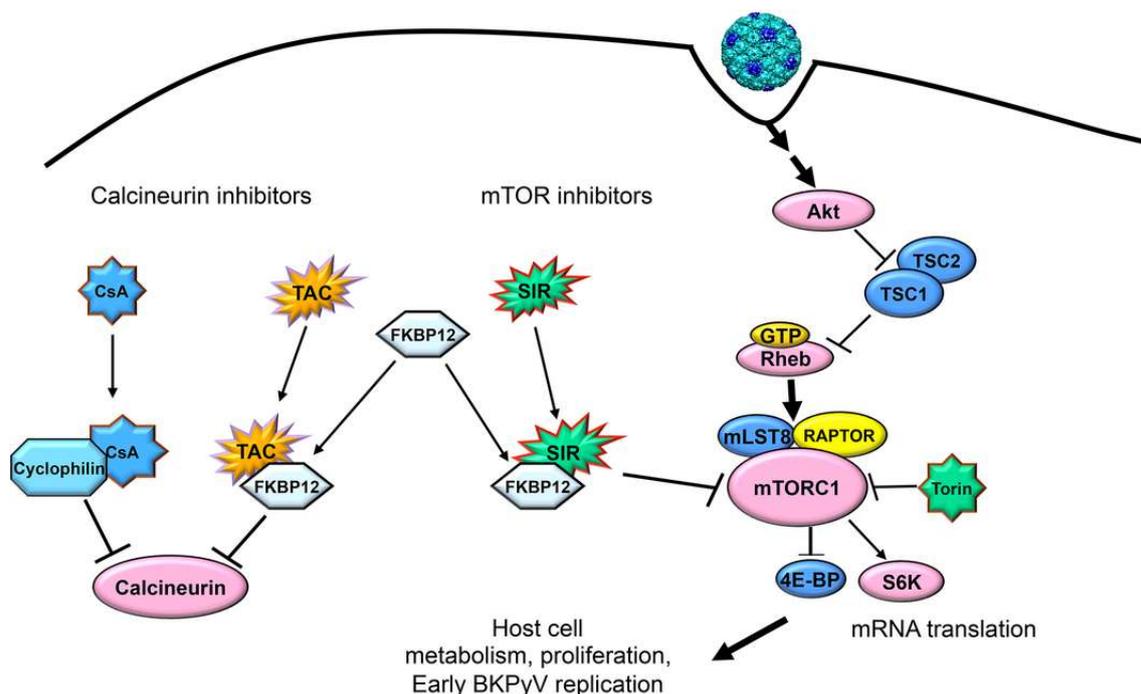


Abbildung 4: Zelluläre Mechanismen der Immunsuppression auf BKV Replikation

Aus Hirsch HH (2016): BK Polyomavirus Replication in Renal Tubular Epithelial Cells Is Inhibited by Sirolimus, but Activated by Tacrolimus Through a Pathway Involving FKBP-12 (Hirsch et al., 2016)

Ferner konnte in einer weiteren Arbeit gezeigt werden, dass in-vivo im Mausmodell der mTOR-Inhibitor Rapamycin einen immunstimulatorischen Effekt auf die Generierung und Differenzierung von virusspezifischen CD8 T-Zellen hat (Araki et al., 2009).

Eine Arbeitsgruppe aus Basel konnte zeigen, dass ein niedriger Zielspiegel des Calcineurin-Inhibitors Tacrolimus bei nierentransplantierten Patienten mit BKV-Nachweis im Urin zu einer verbesserten T-Zell Antwort führt. Interessanterweise bestand kein signifikanter Zusammenhang mit den Mycophenolat-Spiegeln oder der Prednisolondosis. Allerdings wurde die Untersuchung lediglich an 16 Patienten vorgenommen (Egli et al., 2009b). Auch wenn es keine klaren, signifikanten Unterschiede der verschiedenen immunsuppressiven Therapien hinsichtlich des Auftretens einer PVAN gibt, konnte in zwei prospektiven randomisierten Studien ein reduziertes Risiko für das Auftreten einer BKV-Reaktivierung unter CsA und mTOR-Inhibitor verglichen mit Tacrolimus nachgewiesen werden. Ferner erbrachte eine randomisierte Studie eine niedrigere Inzidenz von BKV-Infektionen unter Everolimus verglichen mit MMF (Hirsch et al., 2013b, Tedesco Silva et al., 2010, Vincenti et al., 2007).

1.5 CIDOFOVOIR

Cidofovir wurde als erstes Nukleosidanalogen für die klinische Anwendung bei der Indikation der CMV-Retinitis bei Patienten mit HIV zugelassen. Die antivirale Wirkung des Monophosphat-Nukleosidanalogs basiert darauf, dass nach zellulärer Phosphorylierung zur Diphosphatform eine kompetitive Hemmung der Inkorporation von Deoxycytidin-Triphosphat in die virale DNA durch die virale DNA-Polymerase erfolgt (Lea and Bryson, 1996). Eine einzelne Gabe der Standarddosis für die CMV Retinitis (3-5 mg/kg KG) führt zu Plasmaspitzenkonzentrationen von 7,3 bis 11,5 mg/l. Während über 80% von Cidofovir unverändert über den Urin innerhalb von 24 Stunden ausgeschieden werden, zeigt der aktive Metabolit Cidofovir-Diphosphat eine deutlich langsamere Elimination mit intrazellulärer Halbwertszeit zwischen 24 und 65 Stunden.

Daraus ergibt sich der empfohlene Applikationsabstand bei CMV-Retinitis von 2 Wochen (Lea and Bryson, 1996).

Die relevanteste Nebenwirkung von Cidofovir ist eine dosisabhängige Nephrotoxizität. Die Nephrotoxizität wird nach Aufnahme von Cidofovir über den humanen renalen organischen Anionentransporter 1 (hOAT1) und eine dadurch bedingte proximale Tubulusnekrose mediiert. Neben einer Zytotoxizität mit Tubulusnekrose sind auch Fälle mit funktioneller Störung der proximalen Tubuluszellen beschrieben. Klinisch manifestiert sich diese funktionelle Störung meist über eine Abnahme der Nierenfunktion und über die typischen proximal tubulären Resorptionsstörungen eines Fanconi-Syndroms, gekennzeichnet durch eine Glucosurie, Hyperaminoazidurie, und einen renalen Bikarbonatverlust. Die Nebenwirkungen sind meist nach Beendigung der Therapie mit Cidofovir reversibel (Vittecoq et al., 1997). Aus diesem Grund wird bei der klassischen Indikation für Cidofovir eine Prähydratation mit isotonischer Kochsalzlösung sowie Probenecid appliziert. Probenecid hemmt die basolaterale Aufnahme von Cidofovir über den hOAT1 und kann so die oben genannte Nephrotoxizität reduzieren (Momper et al., 2013). Der Transport von Cidofovir im Tubulusepithel ist in Abbildung 5 graphisch dargestellt.

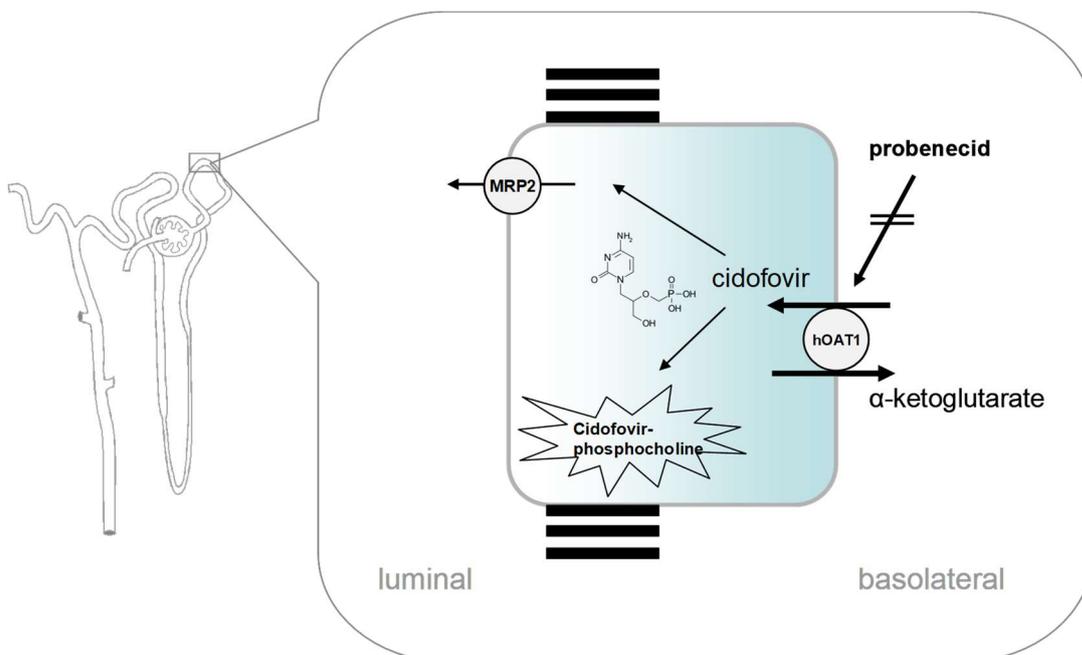


Abbildung 5: Renaler Transport von Cidofovir

Die ersten Hinweise auf einen suffizienten inhibitorischen Effekt auf die Replikation von Polyomaviren in-vitro mittels Cidofovir konnte durch eine belgische Arbeitsgruppe 1997 aufgezeigt werden. Dort wurden diverse antivirale Therapien und deren Effekte auf die in-vitro Replikation von Maus-Polyomaviren und Primaten-SV40-Viren getestet. Es konnte gezeigt werden, dass Cidofovir den stärksten und selektivsten Effekt auf Polyomaviren mit einer 50%igen Hemmkonzentration (EC_{50}) zwischen 4 und 7 $\mu\text{g/ml}$ hatte (Andrei et al., 1997). Untersuchungen für den Einsatz von Cidofovir bei nieren-transplantierten Patienten verwendeten meist niedrig dosiertes Cidofovir mit 0,25 - 1 mg/kg, um das Risiko einer Nephrotoxizität zu minimieren. Mit einer Applikation von 0,24 - 0,62 mg/kg konnten maximale Serumkonzentrationen von 1 $\mu\text{g/ml}$ gemessen werden (Momper et al., 2013). Somit konnten die in-vitro gemessenen EC_{50} für Cidofovir gegen BKV nicht erreicht werden, aber weitere Untersuchungen an Hasen konnten eine 10-fach höhere Konzentration von Cidofovir in Nierengewebe als im Plasma nachweisen (Cundy et al., 1996).

Daraufhin veranlasste, klinische Studien haben den Effekt von Cidofovir bei PVAN untersucht. Eine belgische Arbeitsgruppe um Dirk Kuypers konnte in zwei kontrollierten, unabhängigen Studien bei 21 bzw. 41 nierentransplantierten Patienten einen Nutzen hinsichtlich des Transplantatüberlebens bei PVAN durch die wöchentliche Gabe von 0,5-1 mg/kg Cidofovir bzw. 1 mg/kg Cidofovir erreichen. Bei allen diesen Patienten wurde die Basisimmunsuppression zusätzlich reduziert. Bei der kleineren Studie an 21 Patienten erhielten 8 Patienten Cidofovir in der zuvor genannten Dosierung. Bei allen 8 Patienten stabilisierte sich die Transplantatfunktion ohne Transplantatversagen, wohingegen 9 der 13 Patienten der Kontrollgruppe ein Transplantatversagen erlitten. In der größeren Studie zeigten nur 4 von 26 Patienten, welche mit Cidofovir (1 mg/kg KG) behandelt wurden, ein Transplantatversagen, wohingegen 11 der 15 Patienten ohne Cidofovir ein Transplantatversagen erlitten. (Kuypers et al., 2005, Kuypers et al., 2009).

1.6 ALTERNATIVE THERAPEUTISCHE OPTIONEN

Neben den bereits angesprochenen Interventionsmöglichkeiten durch die Reduktion bzw. Umstellung der Immunsuppression und den Einsatz von Cidofovir finden sich noch folgende weitere antivirale Therapieansätze:

- Intravenöse Immunglobuline (Ivlg): In Anbetracht der hohen Seroprävalenz von BKV-Antikörpern in der Allgemeinbevölkerung beinhalten sämtliche kommerziell erhältliche Ivlg BKV-Antikörper gegen alle BKV Genotypen (Randhawa et al., 2015). Es existieren keine randomisierten oder kontrollierten Studien bezüglich der Effektivität von Ivlg in der Therapie bei PVAN. Ferner finden sich keine einheitlichen Dosierungsschemata für diese Indikation. Eine Studie konnte zeigen, dass bei 8 nierentransplantierten Patienten durch Reduktion der Immunsuppression und Gabe von Ivlg bei 88% der Patienten ein Erhalt der Transplantatfunktion nach einem Zeitraum von 15 Monaten erreicht werden konnte. In diesem Kollektiv wurden Ivlg in einer Dosis von 2 g/kg über 2-5 Tage in Kombination mit einer Reduktion der Immunsuppression verabreicht (Sener et al., 2006).
- Leflunomid: Leflunomid ist ursprünglich für den Einsatz als Basistherapeutikum bei der rheumatoiden Arthritis zugelassen. Untersuchungen konnten jedoch auch antivirale Aktivität gegen Herpes-simplex-Virus (HSV), Zytomegalievirus (CMV) und BKV in-vitro nachweisen (Knight et al., 2001, Farasati et al., 2005). Der Mechanismus der antiviralen Aktivität gegen BKV ist nicht geklärt. Eine retrospektive Untersuchung an 26 nierentransplantierten Patienten mit PVAN untersuchte den Effekt der Umstellung des Antimetaboliten auf Leflunomid sowie eine Reduktion der Tacrolimus Zielspiegel auf 4-6 ng/ml. Zusätzlich erhielten hiervon 9 Patienten Cidofovir (0,25 mg/kg alle 2 Wochen). In diesem Kollektiv erreichten alle 22 Patienten mit Serum-Spiegeln des aktiven Metaboliten von Leflunomid zwischen 50 und 100 µg/ml eine Reduktion der BKV Replikation. Eine Nachbeobachtung der Viruslast im Plasma wurde bei 19 Patienten durchgeführt. 12 dieser 19 Patienten hatten nach 12 Monaten keine nachweisliche Viruslast im Blut. Nur 4 der 26 Patienten hatten über den

Beobachtungszeitraum von 40 Monaten ein Transplantatversagen (Josephson et al., 2006).

- Fluorochinolon-Antibiotika: Verschiedene Studien erbrachten Hinweise auf einen Effekt von Fluorochinolon-Antibiotika gegen BKV (Leung et al., 2005, Ali et al., 2007, Gabardi et al., 2010). Daraufhin wurden 2 randomisierte, kontrollierte Studien veranlasst, welche den prophylaktischen und therapeutischen Einsatz von Levofloxacin untersuchten. In beiden Studien konnte kein Effekt auf die BK-Virämie gezeigt werden (Lee et al., 2014, Knoll et al., 2014).
- Brincidofovir (CMX001): Brincidofovir ist eine oral erhältliches Lipid-Konjugat von Cidofovir. Neben dem Vorteil der oralen Verfügbarkeit scheint anhand von in-vitro Untersuchungen eine verbesserte Aufnahme in die Tubulusepithelzellen zu bestehen und das Risiko der Nephrotoxizität im Vergleich zu Cidofovir geringer zu sein (Rinaldo et al., 2010). Für den Einsatz von Brincidofovir als therapeutische Option bei einer PVAN existieren jedoch bislang keine klinischen Daten.

1.7 FRAGESTELLUNG UND HYPOTHESE

Die Polyomavirus-assoziierte Nephropathie ist trotz der Verbesserungen im Bereich der diagnostischen Möglichkeiten und des gestiegenen medizinischen Verständnisses weiterhin ein häufiges Problem nach Nierentransplantation mit einer fortbestehend relevanten Rate an Transplantatversagen. Neben der etablierten Therapie, der Reduktion der Immunsuppression, konnte sich kein spezifisches Therapieregime bisher durchsetzen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen die Ergebnisse der seit 2005 in Tübingen durchgeführten Therapie der bioptisch gesicherten PVAN mittels Applikation von „low-dose“ Cidofovir (0,25 mg/kg KG) und Umstellung auf eine mTOR-basierte Immunsuppression retrospektiv untersucht werden.

Unsere Hypothese ist, dass Cidofovir unter dem in Tübingen verwendeten Regime selbst bei höhergradig eingeschränkter Nierenfunktion sicher zu applizieren ist und dass zusammen mit der Umstellung auf eine mTOR-basierte Immunsuppression eine Verbesserung von Viruselimination und Transplantatüberleben erreicht werden kann.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 PATIENTEN

Es erfolgte eine retrospektive Analyse aller am Transplantationszentrum Tübingen seit 09/2005 nierentransplantierte Patienten mit virologischem Nachweis einer positiven PCR auf BKV, sowie einer bioptisch gesicherten Polyomavirusnephropathie. Sämtliche Patienten erhielten mindestens einmal eine spezifische antivirale Therapie mit Cidofovir und eine Umstellung auf eine mTOR basierte Immunsuppression. Die Auswertung erfolgte retrospektiv aus den jeweiligen Patientenakten sowie anhand von Laborabfragen und Recherche in den jeweiligen Arztbriefen und virologischen Ergebnissen.

2.2 ETHIK

Ein positives Votum der Ethikkommission an der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls Universität und am Universitätsklinikum Tübingen liegt unter der Projektnummer 651/2016BO2 vor. Demzufolge bestehen keine Bedenken für die retrospektive, pseudonymisierte Auswertung.

2.3 MATERIAL

Die Bestimmung der Virämie erfolgte mittels PCR durch die virologische Abteilung der Universitätsklinik Tübingen. Im Zeitraum bis 2010 wurde die Bestimmung anhand einer PCR auf der Grundlage eines in-house-Protokolls durchgeführt. Im Zeitraum zwischen 2010 und Dezember 2014 wurden die Bestimmungen mit dem „LightMix Kit Polyomaviruses JC and BK“ der Firma TIB MolBiol, Berlin durchgeführt. Seit Dezember 2014 wird das „RealStar BKV PCR Kit 1,0“ der Firma Altona Diagnostics, Hamburg verwendet. Somit war eine Quantifizierung der BKV Replikation erst ab 2010 möglich. Bei den zuvor erfolgten Messungen war lediglich eine qualitative Bestimmung möglich.

2.4 TÜBINGER CIDOFOVIR-PROTOKOLL

Die Applikation von Cidofovir erfolgte nach einem spezifischen Protokoll (siehe Abbildung 6). Entscheidend ist hierbei eine ausreichende Prähydratation, um eine kalkulierte Passagezeit und somit minimierte Toxizität am Tubulusepithel zu erreichen. Die Prähydratation wird mit kristalloider Lösung intravenös durchgeführt, um Urinstundenportionen von 100 ml/Stunde zu erreichen. Ist dies erreicht, erfolgt die Applikation des „low-dose“ Cidofovir mit 0,25 mg/kg Körpergewicht über 6 Stunden. Auf die Inhibition des „human organic anion transporter 1“ (hOAT1) mittels Probenecid, welcher entscheidend für die proximal tubuläre Aufnahme von Cidofovir ist, wird bewusst verzichtet. Die Gewährleistung der tubulären Aufnahme von Cidofovir ist für die BK-Virus Replikationsinhibition essentiell. Die Applikation von Cidofovir erfolgt im „Tübinger Cidofovir-Protokoll“ standardmäßig lediglich als Einmalgabe. Über eine weitere Notwendigkeit zusätzlicher Gaben wird individuell entschieden.

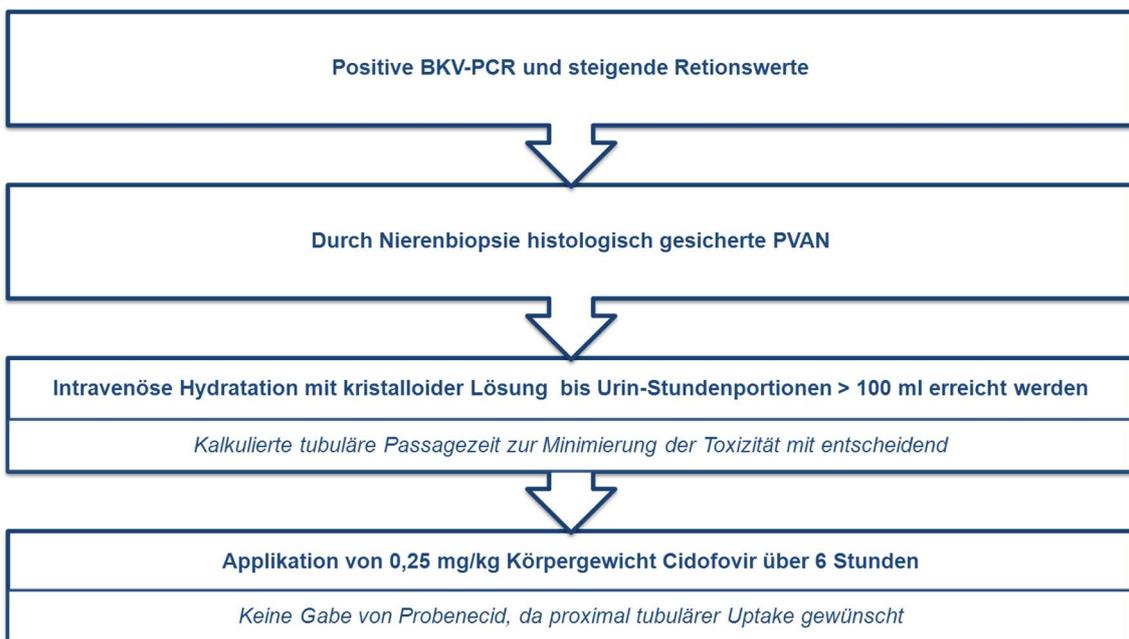


Abbildung 6: Tübingen Cidofovir-Protokoll

2.5 UMSTELLUNG DER IMMUNSUPPRESSION

Bei sämtlichen hier untersuchten Patienten wurde im Zuge eines stationären Aufenthaltes die immunsuppressive Therapie auf ein mTOR basiertes Regime umgestellt. Zur Umstellung wurde die Dosierung des Calcineurin-Inhibitors (CNI) Tacrolimus halbiert und stattdessen ein mTOR-Inhibitor (Everolimus oder Sirolimus) überlappend verabreicht. Nachdem der Zielspiegel des mTOR-Inhibitors erreicht wurde, wurde der CNI abgesetzt.

2.6 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die Datenerhebung, Datenspeicherung und statistische Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel (Microsoft, Redmont, USA) und JMP (Version 13.0, SAS Institute, Cary, NC). Die Daten sind als Median [Interquartile range, IQR] dargestellt. Unterschiede zwischen Gruppen wurden für kontinuierliche Variablen mittels Wilcoxon-Test geprüft. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0.05$ festgelegt.

3 ERGEBNISSE

3.1 BASELINE-CHARAKTERISTIKA

Anhand der Einschluß-Kriterien konnten am Transplantationszentrum Tübingen im Zeitraum zwischen September 2005 und Oktober 2016 19 Patienten identifiziert werden. Hinsichtlich der Geschlechterverteilung waren 84% der betroffenen Patienten männlich und 16% der Patienten weiblich. Bei 53% der Patienten wurde die Nierentransplantation im Rahmen einer Nierenlebenspende durchgeführt, bei 47% handelte es sich um eine postmortale Nierentransplantation. Das mediane Patientenalter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung einer PVAN mittels Nierenbiopsie lag bei 53 [36-58] Jahren. Die Zeit zwischen Nierentransplantation und histologischer Diagnosestellung betrug im Median 268 [153-555] Tage (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Baseline-Charakteristika zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, n=19

Geschlechterverteilung in %	
– Männlich	84 %
– Weiblich	16 %
Modalität der Nierentransplantation in %	
– Nierenlebenspende	53%
– Postmortale Nierentransplantation	47%
Patientenalter in Jahren	53 [36-58]
Dauer Nierentransplantation bis PVAN in Tagen	268 [153-555]

Die initiale Immunsuppression zum Zeitpunkt der Nierentransplantation erfolgte bei allen Patienten mit einer Steroidstoßtherapie mit anschließender Reduktion der Predisolondosis (tapering) nach einem vorgegeben Protokoll. Anhand des Immunstatus wurde in 68% der Patienten zusätzlich eine Induktionstherapie mit dem Interleukin 2 (IL2)-Rezeptor-Antikörper Basiliximab (Simulect) verabreicht. Eine Induktionstherapie mit einem lymphozytendepletierenden Antikörper wie Antithymozytenglobulin (ATG) oder der CD52 Antikörper Alemtuzumab wurde bei keinem der 19 Patienten verwendet. Die restlichen 32% erhielten ausschließlich die Stoßtherapie mit Methylprednisolon ohne eine weitere Induktionstherapie (siehe Tabelle 2). Die Standard-Basisimmunsuppression wurde mit Tacrolimus, MMF und Prednisolon durchgeführt.

<u>Tabelle 2: Induktionstherapie, n=19</u>	
Methylprednisolonstoßtherapie alleinig	32%
Basiliximab	68%
Lymphozytendepletierende Antikörper	0%

Sämtliche Patienten mit Erstdiagnose vor 2010 (n=3) hatten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eine positive qualitative PCR für BKV im Plasma. Die mediane Kopienzahl anhand der PCR aus dem Serum lag bei den Patienten nach 2010 (n=16) bei 65.500 Kopien BKV-DNA/ml Plasma [IQR 29.000-174.250] (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: BKV-DNA zum Zeitpunkt der Diagnose

PCR nach in-house-Protokoll ohne Quantifizierung	n=3
Quantitative PCR zum Zeitpunkt der Histologie	n=16
– qPCR Kopien BKV-DNA/ml Plasma	65.500 [29.000-174.250]

3.2 THERAPEUTISCHE INTERVENTIONEN

3.2.1 Cidofovir

Nach histologischer Sicherung einer PVAN wurde bei den 19 Patienten Cidofovir nach dem oben genannten „Tübingen Cidofovir Protokoll“ verabreicht. Bei 10 Patienten wurde Cidofovir lediglich einmalig verabreicht. Bei 7 Patienten wurde die Indikation zur 2. Gabe von Cidofovir gestellt. Lediglich bei 2 Patienten wurde eine 3. Gabe von Cidofovir aufgrund des Verlaufs als notwendig eingeschätzt. Der mediane Abstand zwischen den Cidofovir Gaben bei erfolgter mehrfacher Applikation lag bei 58 Tagen [IQR 43-119] (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Cidofovir

Einmalige Applikation	n=10, (53%)
Zweimalige Applikation	n=7, (37%)
Dreimalige Applikation	n=2, (10%)
Abstand zwischen Cidofovir in Tagen	58 [43-119]

Die im Median verabreichte Kumulativdosis von Cidofovir betrug 25,25 mg [18,6-30]. Vergleicht man die Kumulativdosen der Patienten mit einmaliger, zweimaliger und dreimaliger Applikation, findet sich eine mediane Kumulativdosis von 18,6 mg [16,3-20], 30mg [28-33] bzw. 58,6 mg [55,4-61,9] (siehe Tabelle 5).

<u>Tabelle 5: Cidofovirdosis</u>	
Kumulativdosis Cidofovir (mg); einmalige Applikation	18,6 [16,3-20]
Kumulativdosis Cidofovir (mg); zweimalige Applikation	30 [28-33]
Kumulativdosis Cidofovir (mg); dreimalige Applikation	58,6 [55,4-61,9]
Kumulativdosis Cidofovir (mg); alle Patienten	25,25 [18,6-30]

3.2.2 mTOR-Inhibitor

Alle 19 untersuchten Patienten erhielten eine Umstellung der Immunsuppression auf eine mTOR-basierte Immunsuppression. Von den umgestellten 19 Patienten musste der mTOR-Inhibitor bei 4 Patienten (21%) rückumgestellt werden. Die Gründe hierfür waren bei 2 Patienten schwere apthöse Läsionen. Bei einem Patienten war nach Ausheilung der PVAN eine schwere zelluläre Rejektion aufgetreten, weshalb eine Rückumstellung auf eine CNi-basierte Immunsuppression erfolgte. Ein weiterer Patient wurde nach Entwicklung von Donor-spezifischen Antikörpern (DSA) und refraktärem Verlauf der PVAN auf Leflunomid umgestellt. Die mediane Dauer bis zur Rückumstellung der Immunsuppression mit Beendigung des mTOR-Inhibitors lag bei den 4 Patienten bei 86 Tagen [IQR 59-179] (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Umstellung auf mTOR basierte Immunsuppression, n=19

Dauerhafte Beibehaltung mTOR basierten Immunsuppression	n=15, (79%)
Beendigung des mTOR Inhibitors	n=4, (21%)
- Aphten	n=2, (11%)
- Rejektion	n=1, (5%)
- DSA und refraktäre PVAN	n=1, (5%)
Dauer bis Rückumstellung mTOR-Inhibitor in Tagen	86 [59-179]

3.2.3 Begleittherapie

Nach Erhalt der histologischen Aufarbeitung mit Nachweis einer PVAN wurde, je nach Ausmaß der lymphocellulären Infiltration, parallel zur Therapie mit Cidofovir teilweise ein Steroidstoß gewichtsadaptiert mit 250 mg oder 500 mg Prednisolon über 3 Tage durchgeführt. Von den 19 Patienten erhielten 13 Patienten einen Steroidstoß parallel zur Cidofovir Gabe. Bei 4 Patienten wurde keine hochdosierte Prednisolontherapie verabreicht. Von den verbleibenden 2 Patienten wurde bei einem Patienten nur eine moderate Erhöhung der Prednisolondosis auf 30 mg für 3 Tage mit anschließendem tapering auf die Erhaltungsdosis durchgeführt. Der andere Patient hatte bei mehrfachen Cidofovirgaben nur teilweise einen Steroidstoß erhalten (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Steroidstoß zusätzlich zu Cidofovir

Steroidstoß über 3 Tage (250 oder 500mg/Tag)	n=13, (68%)
Steroidstoß nicht bei jeder Cidofovirgabe	n=1, (5%)
Kein Steroidstoß	n=4, (22%)
Passagere Erhöhung Prednisolon (30mg)	n=1, (5%)

3.3 EXEMPLARISCHE DARSTELLUNG EINES VERLAUFS UNTER THERAPEUTISCHER INTERVENTION

Hierbei handelt es sich um einen männlichen, zum Zeitpunkt der Transplantation 57-jährigen Patienten. Als Grunderkrankung findet sich ein Alport-Syndrom. Bei der Transplantation handelt es sich um eine postmortale Nierenspende.

Bei dem Patienten war 3 Monate nach Transplantation erstmalig bei Anstieg der Retentionswerte eine BK-Virämie mit Nachweis von 38.000 Kopien/ml Plasma nachweislich. Anhand einer daraufhin veranlassten Nierenbiopsie wurde die Diagnose einer PVAN gestellt. In der Histologie zeigte sich eine geringe lymphoplasmazelluläre Infiltration im Interstitium mit geringer interstitieller Fibrose/Tubulusatrophie von 5%, passend zu einer PVAN-A Läsion.

Daraufhin wurde ein Steroidstoß und einmalig Cidofovir 0,25 mg/kg Körpergewicht verabreicht. Ferner wurde die bisherige Immunsuppression von Tacrolimus/Cellcept/Prednisolon auf eine mTOR-basierte Immunsuppression mit Tacrolimus/Sirolimus/Prednisolon umgestellt.

Im weiteren Verlauf zeigte sich ein progredientes „creeping creatinine“ und ein massiver Anstieg der BKV-DNA Kopien in der PCR auf 887.000 Kopien/ml Plasma, weshalb 2 Monate später eine neuerliche Nierenbiopsie durchgeführt wurde. Hierbei zeigte sich ein deutlich progredienter Befund mit nun schwerer lymphoplasmazellulärer Infiltration und Zunahme der interstitiellen Fibrose/Tubulusatrophie auf 10%, nun entsprechend einem PVAN-B Befund. In Anbetracht dieses Befundes wurde nochmals ein Steroidstoß und Cidofovir verabreicht. Die Immunsuppression wurde vorerst beibehalten.

Hierunter stabilisierte sich die Nierenfunktion langfristig bis aktuell 50 Monate nach Transplantation. Bereits 7 Monate nach Transplantation und somit 2 Monate nach der 2. Applikation von Cidofovir war die Zahl der BKV-DNA unterhalb der Nachweisgrenze von 1000 Kopien/ml im Plasma gesunken.

Abbildung 7 stellt den Verlauf des Serum-Kreatinins und der Viruslast anhand der BKV-DNA Kopienzahl grafisch dar.

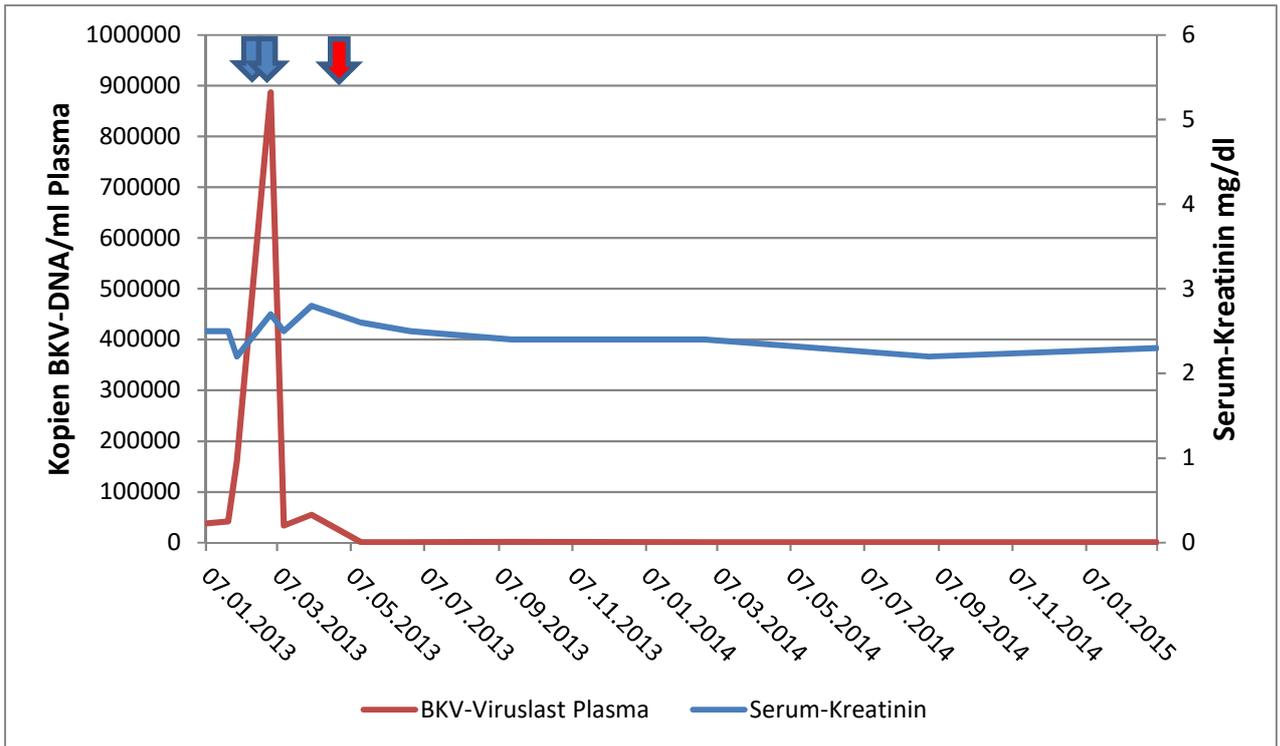


Abbildung 7: Exemplarischer Verlauf unter therapeutischer Intervention

Legende Abbildung 7:

- 2 malig Steroidstoß und 0,25mg/kg Cidofovir und Umstellung auf mTOR basierte Immunsuppression
- Negative BKV PCR im Plasma

3.4 OUTCOME BK-VIRÄMIE

Die retrospektive Auswertung der 19 Patienten erbrachte eine Clearance der BK-Virämie, gekennzeichnet durch eine Reduktion der Kopienzahl unterhalb der Nachweisgrenze von 1000 BKV-DNA Kopien/ml, bei 15 Patient (79 %). Zwei weitere Patienten welche erst vor kürzerer Zeit eine Therapie erhalten hatten, zeigen bereits eine deutliche Reduktion der BKV-Kopienzahl, jedoch noch keinen Abfall unterhalb die Nachweisgrenze von 1000 BKV-DNA Kopien/ml. Die mediane Dauer bis zur Clearance betrug 106 Tage [IQR 75-222] (siehe Tabelle 8). Hinsichtlich der Frage nach Prädiktoren für die Zeitdauer bis zur Virusclearance zeigte sich weder für die Viruslast, noch für die eGFR und den Diagnosezeitpunkt nach Transplantation eine signifikante Korrelation ($r^2 < 0.25$ für alle Parameter).

Tabelle 8: Outcome BK-Virämie, n=19

Dauer bis Clearance der BK-Virämie	106 [75-222]
Clearance BKV-Virämie	n=15, (79%)
Keine Clearance BKV-Virämie	n=4, (21%)

Die graphische Darstellung in Abbildung 8 zeigt die kumulative BKV-Clearance über die Zeit. In der y-Achse ist die Rate an BKV-Clearance im Plasma aufgetragen. In der x-Achse dargestellt wird die Zeit ab der histologischen Diagnosestellung. Wie bereits zuvor wurde die BKV-Clearance definiert als ein Abfall der Virämie auf unterhalb der Nachweisgrenze von 1000 BKV-DNA Kopien/ml.

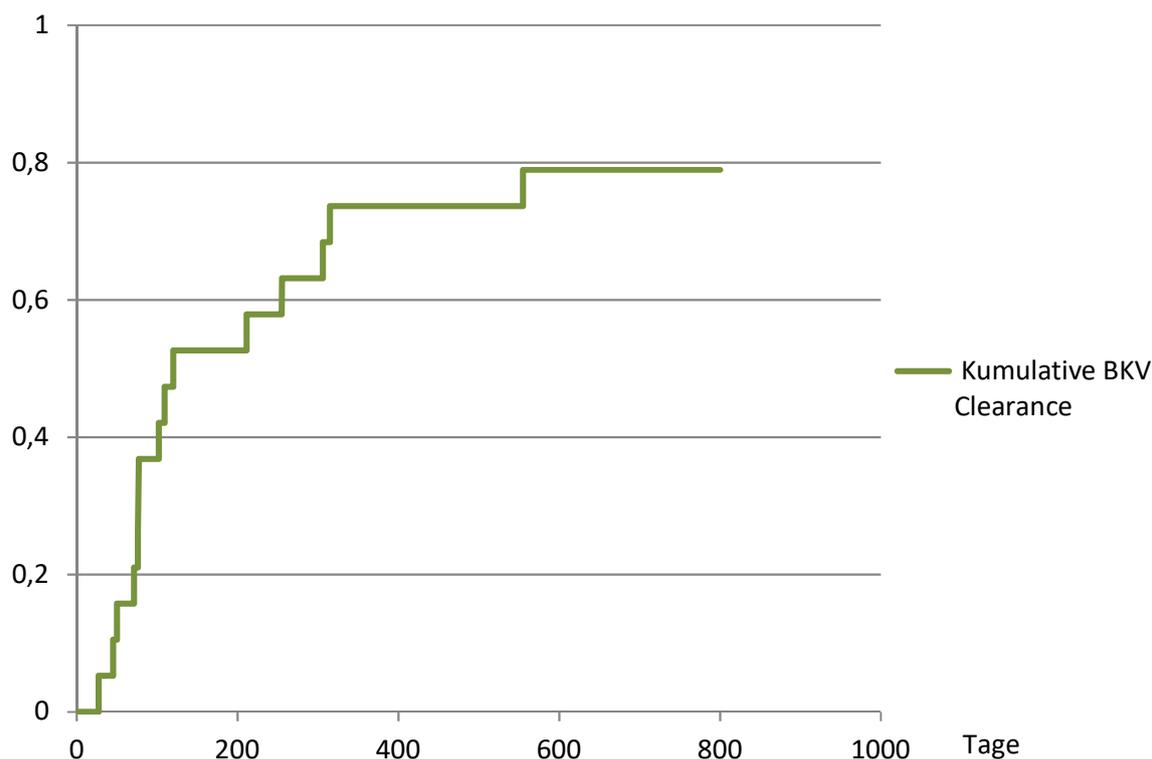


Abbildung 8: Kumulative BKV-Clearance aller 19 Patienten

3.5 VERGLEICH VON PATIENTEN MIT UND OHNE VIRUSCLEARANCE

Bei der Patientengruppe, welche im Verlauf keine Virusclearance erreichte, war zum Diagnosezeitpunkt eine im Median deutlich höhere Viruslast nachweislich, als bei der Patientengruppe, welche im Verlauf ein Abfall der Virusreplikation im Plasma auf < 1000 Kopien/ml erreichte, auch wenn ein statistisches Signifikanzniveau nicht erreicht wurde (510000 [122150-902500] vs. 42000 [25500-109250] Kopien/ml, $p = 0.07$), wie in Abbildung 9 graphisch dargestellt. Zudem lag die eGFR MDRD der Patientengruppe ohne Clearance der Virämie zum Zeitpunkt der Cidofovir Applikation deutlich höher, als bei Patienten die eine Virusclearance erzielten (40 [24-46] vs. 31 [27-37] ml/min/1.73m², $p = 0.07$) wie in Abbildung 10 graphisch dargestellt. Hinsichtlich dem Diagnosezeitpunkt nach Transplantation ergab sich jeweils kein signifikanter Unterschied ($p = 0.27$).

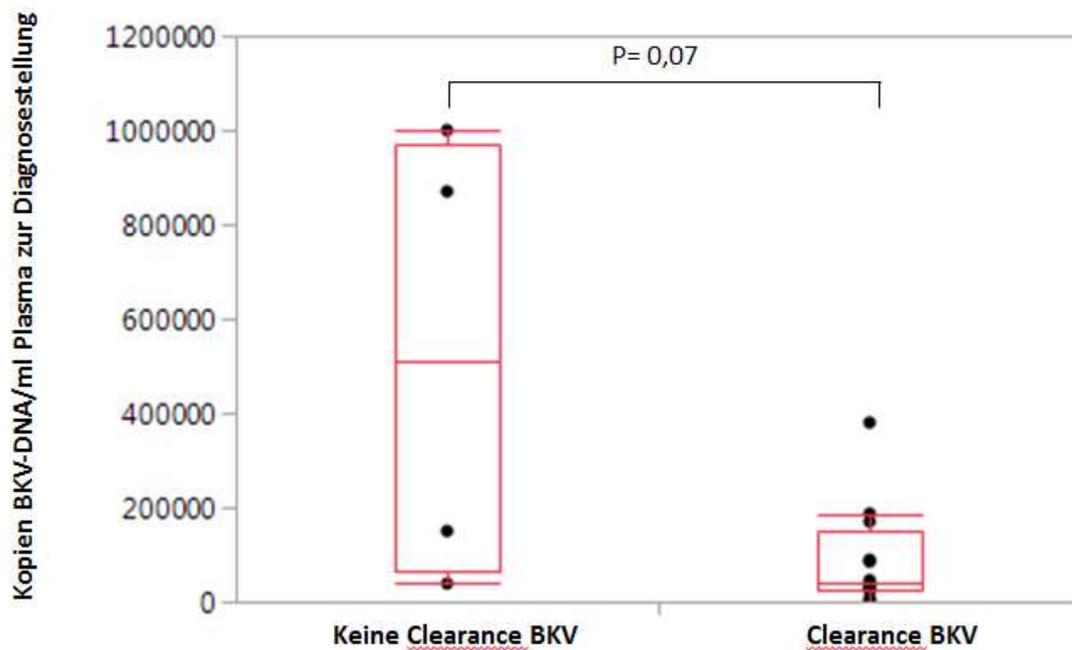


Abbildung 9: Kopienzahl BKV-PCR zum Diagnosezeitpunkt bei Patienten ohne und mit Virusclearance

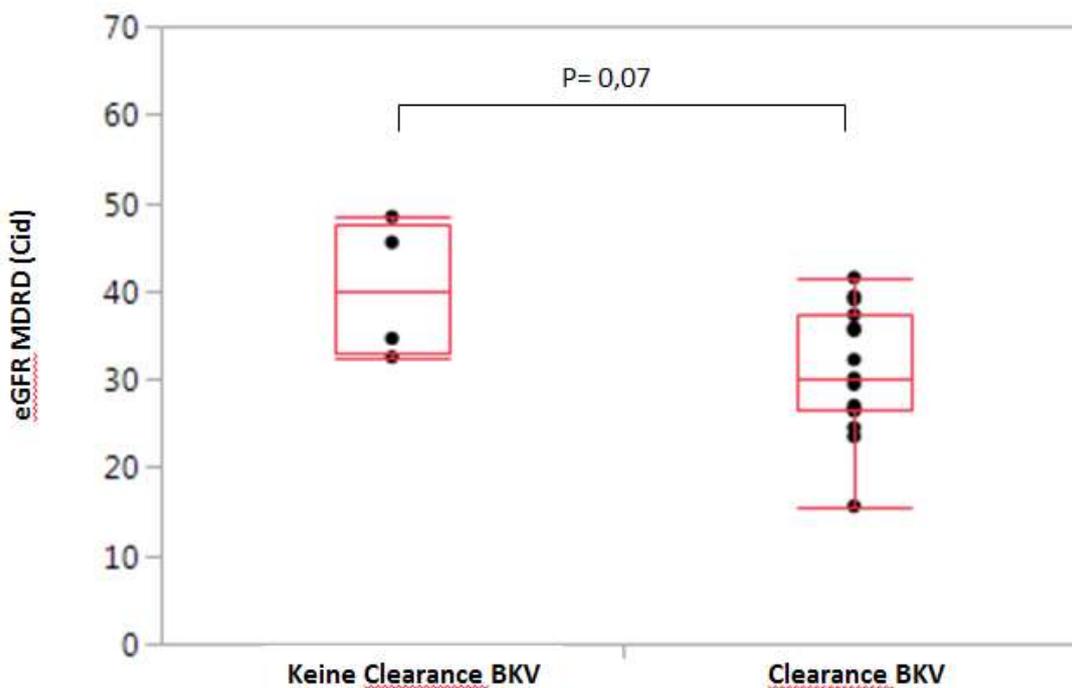


Abbildung 10: eGFR MDRD zum Zeitpunkt Cidofovir Applikation bei Patienten ohne und mit Virusclearance

3.6 OUTCOME TRANSPLANTATFUNKTION

Betrachtet man den Verlauf der Transplantatfunktion, gemessen an der eGFR-MDRD, zeigt sich zum Zeitpunkt der Cidofovir Applikation bereits eine deutlich eingeschränkte Transplantatfunktion mit einer eGFR von im Median 29,4 ml/min/1,73m². Einen Monat nach Cidofovir zeigt sich eine tendenzielle Transplantatfunktionsverschlechterung auf einen Median von 25,8 ml/min/1,73m². 90 Tage nach Applikation von Cidofovir kam es zu einer Stabilisierung bzw. Besserung der Nierenfunktion auf eine mediane eGFR-MDRD von 26,5 ml/min/1,73m². Zum Zeitpunkt der BKV Clearance lag die Mediane eGFR MDRD bei 25,5 ml/min/1,73m². Insgesamt ist im Langzeitverlauf die durch die PVAN bedingte Verschlechterung der Transplantatfunktion gestoppt worden und die Transplantatfunktion erhalten geblieben (siehe Tabelle 9 und Abbildung 11).

Tabelle 9: Transplantatfunktion nach Cidofovir, n=19

eGFR MDRD zum Zeitpunkt Cidofovir	29,4 [25,0-35,6]
eGFR MDRD 30 Tage nach Cidofovir	25,8 [21,1-30,3]
eGFR MDRD 90 Tage nach Cidofovir	26,5 [23,4-36,5]
eGFR MDRD bei BKV-Clearance, Median 106 [75-222] Tage	25,5 [19,7-27]

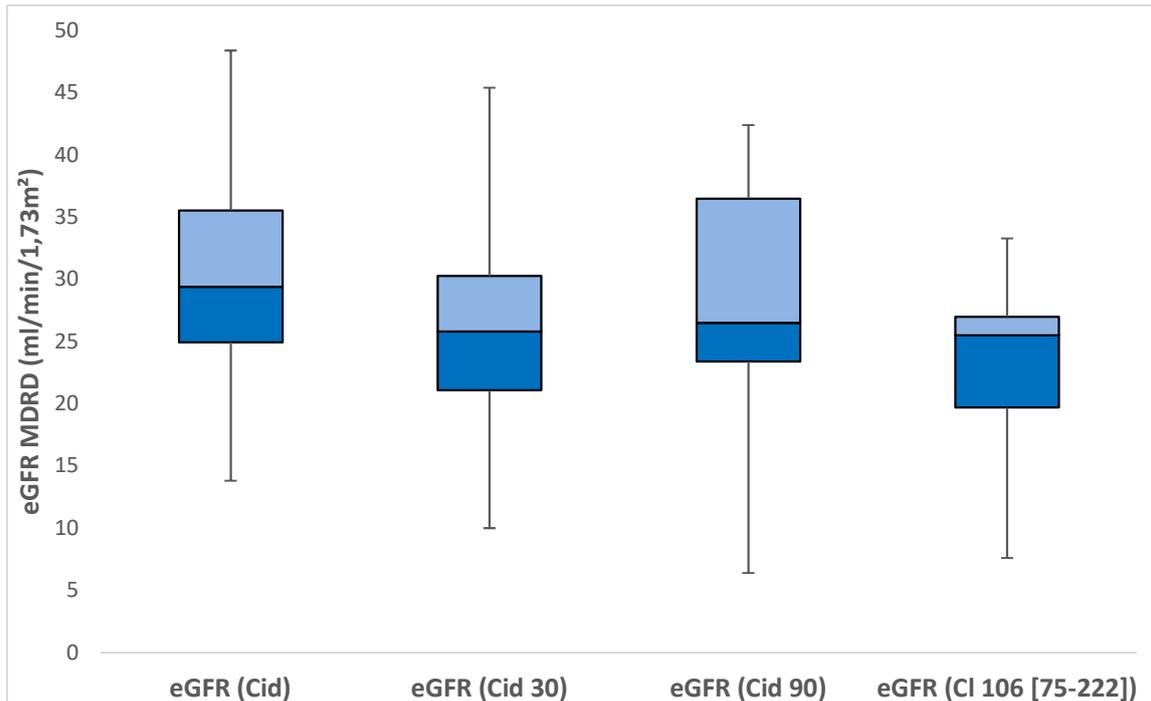


Abbildung 11: Outcome Transplantatnierenfunktion gemessen an der eGFR

Legende Abbildung 11:

eGFR (Cid)..... eGFR zum Zeitpunkt der Cidofovir Applikation

eGFR (Cid 30)... eGFR zum Zeitpunkt 30 Tage nach Cidofovir Applikation

eGFR (Cid 90)... eGFR zum Zeitpunkt 90 Tage nach Cidofovir Applikation

eGFR (CI).....eGFR zum Zeitpunkt der Clearance der BK-Virämie (Median 106 [75-222] Tage nach Cidofovir Applikation)

Bei 7 der hier untersuchten 19 Patienten (37%) kam es im Beobachtungszeitraum von im Median 4,06 Jahren (Min 0,11 Jahre, Max 9,92 Jahre) zu einem Transplantatversagen mit neuerlicher Dialysepflichtigkeit. Es ist jedoch hervorzuheben, dass von den 7 Patienten mit Transplantatversagen nur 2 Patienten (10,5%) die Transplantatfunktion aufgrund einer PVAN verloren hatten. Die anderen Ursachen für das Transplantatversagen waren kardiogene Ursachen, Rejektion oder Rekurrenz der Grunderkrankung (siehe Tabelle 10 und Abbildung 12).

Tabelle 10: Outcome Transplantatfunktion, n=19

Kein Organverlust	n=12 (63%)
Organverlust durch PVAN	n=2 (10,5%)
Dialysepflichtigkeit durch andere Ursachen	n=5 (26,5%)

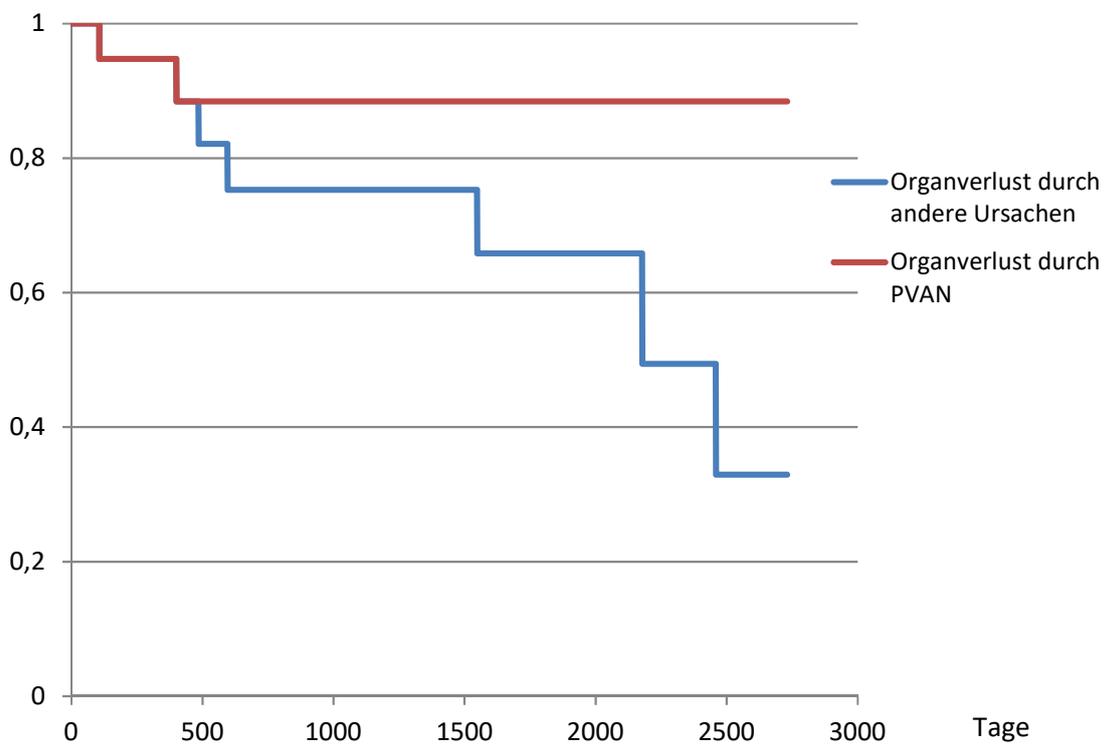


Abbildung 12: Transplantatverlust bedingt durch PVAN und aufgrund anderer Ursachen ab dem Zeitpunkt der histologischen Diagnosestellung

4 DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass der therapeutische Ansatz zur Behandlung einer histologisch gesicherten Polyomavirus-assoziierten Nephropathie bestehend aus und der Applikation von low-dose Cidofovir und einer Umstellung auf eine mTOR-basierte Immunsuppression mit einer hohen Clearance-Rate der BK-Virämie und einer Stabilisierung der Transplantatfunktion verbunden ist. Die Applikation einer effektiven Dosis von Cidofovir war unter dem hier verfolgten Regime sicher und ohne relevante Nephrotoxizität möglich.

Die Auswertung der Baseline-Charakteristika erbrachte einen medianen Diagnosezeitpunkt der PVAN, gekennzeichnet durch die histologischen Veränderungen in der Nierenbiopsie, 268 Tage nach Nierentransplantation. Diese Daten stimmen mit dem bisher in der Literatur beschriebenen Häufigkeitsgipfel im ersten Jahr nach Transplantation überein (Hirsch and Steiger, 2003, Hirsch et al., 2002). Der späteste Diagnosezeitpunkt einer PVAN erfolgte in dem hier untersuchten Patientenkollektiv jedoch erst 2908 Tage (7,9 Jahre) nach Nierentransplantation. Bisherige Untersuchungen konnten bereits zeigen, dass trotz der Häufung in der Frühphase nach Nierentransplantation eine PVAN prinzipiell zu jedem Zeitpunkt auftreten kann (Hirsch et al., 2002). Aus diesem Grund sollte auch zu einem späten Zeitpunkt bei Patienten nach Nierentransplantation an die Möglichkeit einer BK-Virus assoziierten Nephropathie gedacht werden und entsprechende diagnostische Schritte mittels PCR eingeleitet werden. Insbesondere sollte das Risiko einer PVAN nach erfolgten Rejektionstherapien sowie nach einer Umstellung der Immunsuppression bedacht werden.

4.1 THERAPEUTISCHE INTERVENTIONEN

Die Behandlung einer PVAN besteht leitliniengerecht alleinig in der Reduktion der immunsuppressiven Therapie (KDIGO, 2009). Der therapeutische Einsatz von Cidofovir beruht auf den erfolgreichen in-vitro Untersuchungen und den

kontrollierten klinischen Untersuchungen von der Arbeitsgruppe um Dirk Kuypers (Kuypers et al., 2005, Kuypers et al., 2009, Andrei et al., 1997).

Die Auswertung der aktuellen Daten zeigt, dass die Verwendung von Cidofovir unter dem Regime einer einmaligen Applikation mit 0,25 mg/kg auch bei höhergradig eingeschränkter Nierenfunktion ohne nachweisliche Nephrotoxizität durchgeführt werden kann. Ferner waren unter der Verabreichung in dieser Dosierung keine relevanten sonstigen Nebenwirkungen nachweisbar. Unter der deutlich höheren Dosierung, die in den Studien von Herrn Kuypers eingesetzt wurden (0,5-1 mg/kg in wöchentlich Abständen), war ebenso keine relevante Nephrotoxizität beschrieben. Die Transplantatfunktion in den Studienpopulationen von Dirk Kuypers war mit einer Kreatinin-Clearance zum Zeitpunkt der Diagnosestellung mit 36 bzw. 28,4 ml/min vergleichbar mit der eGFR MDRD von 29,4 ml/min/1,73 m² in der hier untersuchten Patientengruppe. Bei den Studien von Kuypers fanden sich jedoch Fälle einer schweren anterioren Uveitis nach 6-8 Gaben von Cidofovir. Zwei Patienten hatten aufgrund dessen einen dauerhaften Visusverlust. Ferner wurden einzelne Fälle mit lokalen Hautreaktionen beschrieben (Kuypers et al., 2005, Kuypers et al., 2009).

Im hier untersuchten Patientenkollektiv betrug die mediane kumulative Dosis von Cidofovir 25,25 mg. In den Studien von Kuypers et. al. wurde die mediane Dosierung nicht angegeben. Betrachtet man jedoch die dort eingesetzte Dosierung von 0,5-1 mg/kg KG (anstatt 0,25 mg/kg KG) und die geplante, wöchentliche Verabreichung für 4-10 Wochen, wurden kumulativ deutlich höhere Dosierungen von Cidofovir verabreicht. Die dort durchgeführten in-vivo Messungen der „peak“-Konzentrationen betragen allerdings nur etwa 1/10 der in-vitro 50% effektiven Konzentration (EC₅₀). Die in-vitro 50% inhibitorische Konzentration (IC₅₀) wurde sogar nur zu ca. 1/20 erreicht [55]. Beim aktuellen Patientenkollektiv in Tübingen wurden keine Messungen der Cidofovir Serumkonzentration vorgenommen worden. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die Serumkonzentrationen deutlich niedriger waren, als in den belgischen Studien von der Arbeitsgruppe von Dirk Kuypers.

Im Gegensatz zu dem Nebenwirkungspotential ist für die antivirale Wirkung von Cidofovir die intrazelluläre Konzentration in den Tubulusepithelzellen relevant. Sowohl in den Studien von Kuypers et. al. als auch im aktuellen Patientenkollektiv wird bewusst auf die Verbreitung von Probenecid verzichtet. Probenecid hemmt die tubuläre Aufnahme von Cidofovir. Bei dem antiviralen Einsatz gegen BKV ist eine ausreichend hohe Konzentration in den Tubulusepithelzellen gewünscht, um eine Inhibition der Virusreplikation zu erreichen. Wünschenswert wären Messungen der intrazellulären Cidofovir Konzentration im Tubulusepithel. Cundy et al. konnten anhand von Hasen zeigen, dass radioaktiv markiertes Cidofovir sich 10-fach stärker intrarenal als im Plasma anreichert. In Anbetracht der hohen Rate an BKV-Clearance bei den hier untersuchten 19 Patienten erscheint der inhibitorische Effekt von Cidofovir bereits in der hier eingesetzten Dosierung bei vielen Patienten ausreichend zu sein. Es ist jedoch hervorzuheben, dass nur 53 % der hier untersuchten Patienten mit der einmaligen Applikation ausreichend behandelt wurden. 47 % der Patienten benötigten 2 oder 3 Gaben von Cidofovir. Die statistische Auswertung konnte zeigen, dass Patienten mit besseren eGFR MDRD zum Zeitpunkt der erstmaligen Cidofovir-Applikation ein schlechteres Outcome hinsichtlich BKV-Clearance hatten, wenngleich das Signifikanzniveau nicht erreicht werden konnte. Ferner hatten alle Patienten mit mehrfacher Cidofovir-Applikation eine Clearance der BK-Virämie erreicht. Diese Aspekte sprechen dafür, dass ein abgewandeltes Regime mit repetitiven Cidofovir-Applikationen Vorteile bei PVAN zu haben scheint. Höhere Einzeldosierungen erhöhen das Toxizitätsrisiko, wie in den Studien von Herrn Kuypers durch die dort festgestellten Fälle von schwerer Uveitis und Hautreaktionen zu sehen war.

Die ausgewerteten Daten konnten zeigen, dass eine Umstellung auf eine mTOR-basierte Immunsuppression bei PVAN in den meisten Fällen möglich ist. In 79 % der Patienten konnte das mTOR-basierte immunsuppressive Regime beibehalten werden. Lediglich bei 4 Patienten (21 %) musste der mTOR-Inhibitor zwischenzeitlich aufgrund von typischen Nebenwirkungen dieser Substanzklasse beendet werden. Auch diese sind im wesentlichen von den Medikamentenspiegeln abhängig.

Randomisierte Studien konnten eine niedrigere Rate an BKV-Replikation nach Nierentransplantation unter mTOR-Inhibitoren verglichen mit Mycophenolsäure zeigen (Hirsch et al., 2013b, Tedesco Silva et al., 2010, Vincenti et al., 2007). Es existieren jedoch keine randomisierten Interventionsstudien, die den Effekt der Umstellung der Immunsuppression bei manifester PVAN mit verschiedenen Strategien vergleichend untersucht haben. Die Empfehlung der Leitlinie zur Reduktion der Immunsuppression lässt dem behandelnden Arzt viel Spielraum, auf welchem Weg dies umgesetzt werden soll. Das Verständnis der möglichen pathophysiologischen Mechanismen der verminderten Virusreplikation bzw. Viruselimination durch mTOR-Inhibitoren über die SP6 Kinase-Aktivierung und Generierung und Differenzierung von virusspezifischen CD8 T-Zellen unterstützt den hier verfolgten Weg der Umstellung auf eine mTOR-basierte Immunsuppression (Araki et al., 2009, Hirsch et al., 2016). Klinische Interventionsstudien auf den Verlauf einer BKV-Infektion nach Umstellung auf mTOR-Inhibitoren sind in der Literatur kaum zu finden. Eine aktuelle Untersuchung aus dem Jahr 2016 aus Taiwan konnte eine Reduktion der Virusreplikation im Urin und signifikante Besserung der eGFR nach Umstellung auf Everolimus nach einem Zeitraum von 24 Monaten aufzeigen (Yen et al., 2016). Hierbei handelte es sich jedoch nicht um Patienten mit histologisch gesicherter PVAN sondern lediglich um Patienten mit nachweislicher BK-Virurie. Eine Alternative kann bei Kontraindikationen für eine Umstellung von Tacrolimus auf mTOR-Inhibitoren eine Umstellung auf Ciclosporin A darstellen. Auch hierfür existieren sowohl in-vitro Daten für eine Reduktion der Virusreplikation als auch die zuvor genannten randomisierten Studien für die reduzierte Entwicklung einer BKV-Virämie im Vergleich zu Tacrolimus (Hirsch et al., 2013b, Hirsch et al., 2016). Demzufolge sind die antiviralen Effekte von mTOR-Inhibitoren anhand der eben genannten Daten gut belegt. Im Falle einer manifesten, histologisch gesicherten PVAN mit Transplantatfunktionsverschlechterung und dem hohen Risiko eines Transplantatversagens erscheint jedoch der hier verfolgte duale therapeutische Ansatz mit zusätzlich spezifischer antiviraler Therapie mit Cidofovir erfolgversprechend.

Als möglicher therapiemodulierender Faktor muss die Gabe von Kortikosteroiden betrachtet werden. Von den 19 Patienten erhielten 13 Patienten (68 %) zusätzlich zur Cidofovir-Gabe und Umstellung auf eine mTOR-basierte Immunsuppression einen Steroidstoß mit 250 - 500mg Prednisolon intravenös über 3 Tage. Die Entscheidung hierfür wurde individuell anhand des Nierenbiopsiebefundes durch den betreuenden Arzt getroffen. In der histologischen Aufarbeitung zeigen sowohl eine T-Zell vermittelte Rejektion als auch die PVAN eine Tubulitis mit lymphoplasmazellulärer Infiltration. Die Differenzierung erfolgt über die immunhistochemische Aufarbeitung mit intrazellulärem Nachweis von SV40, welcher pathognomonisch für eine PVAN ist. Die klassische Therapie einer zellulären Rejektion besteht in einer Stoßtherapie mit Methylprednisolon bzw. Prednisolon oder anhand von lymphozytendepletierenden Antikörpern. Mehrfach konnte gezeigt werden, dass eine PVAN häufig fortschreitet, wenn eine Abstoßungstherapie durchgeführt wird, oder die immunsuppressive Therapie unverändert fortgeführt wird (Binet et al., 1999, Randhawa et al., 1999, Hirsch et al., 2002, Celik et al., 2003). Bei der relativ großen Studie von Hirsch et. al. aus dem NEJM konnten Abstoßungstherapien mit Steroidstoß und HLA-mismatches als Hauptrisikofaktoren für zunehmende BKV-Replikation und PVAN gezeigt werden. In Fallberichten hingegen konnte ein kombiniertes Vorgehen mit initialer Abstoßungstherapie und anschließender Reduktion der Immunsuppression zu einer Besserung Stabilisierung der Transplantatfunktion führen (Mayr et al., 2001). Im hier untersuchten Patientenkollektiv wurde nach dem kurzzeitigen Steroidstoß die Prednisolondosis rasch reduziert und zusätzlich in den meisten Fällen die Immunsuppression umgestellt sowie eine virusspezifische Therapie ergänzt. Hierunter konnte meist eine rasche Verbesserung der Transplantatfunktion erreicht werden. Somit lässt sich das hiesige Vorgehen nicht mit sonstig publizierten therapeutischen Regimen vergleichen. Zusammenfassend bleibt unklar ob die verabreichte hochdosierte Steroidtherapie förderlich ist bzw. anhand von welchen histologischen Kriterien die Entscheidung für einen Steroidstoß getroffen werden sollte. Sollte es bei einer schweren Tubulitis jedoch koinzident zu einer Rejektion gekommen sein

und man ausschließlich die Immunsuppression reduziert ist sicherlich von einem schlechten Verlauf hinsichtlich der Transplantatfunktion auszugehen.

Bei der hier ausgewerteten Untersuchung handelt es sich um eine retrospektive Untersuchung. Nachdem bei den hier ausgewerteten 19 Patienten eine duale therapeutische Intervention mit Applikation von „low-dose“ Cidofovir und Umstellung auf eine mTOR-basierte Immunsuppression durchgeführt wurde, ist ein Vergleich der Wertigkeit dieser beiden Interventionen nicht möglich. Hierfür müsste eine randomisierte, kontrollierte Studie mit Vergleich dieser beiden Interventionen erfolgen.

4.2 EVALUATION THERAPIEERFOLG

Eine Arbeit von Hirsch et al. aus dem NEJM aus dem Jahr 2002 konnte bereits zeigen, dass die BKV-PCR aus dem Plasma eine hohe Sensitivität und Spezifität hinsichtlich der PVAN aufweist. In der dortigen Arbeit konnte anhand von 78 nierentransplantierten Patienten gezeigt werden, dass bei einer DNA-Kopienzahl von mindestens 7700 Kopien/ml eine PVAN histologisch in 100% der Patienten nachweislich war (Hirsch et al., 2002). Somit existiert hiermit ein breit zugängliches, nicht-invasives „Tool“ um eine PVAN frühzeitig zu erkennen. Bisher war die Wertigkeit der Höhe der Kopienzahl im Plasma bezüglich der renalen Prognose oder gar eines hiernach individuell angepassten Therapieregimes unklar. Die statistische Auswertung der hier untersuchten 19 Patienten konnte zeigen, dass eine höhere Replikation von BKV im Plasma zum Diagnosezeitpunkt mit einer schlechteren Prognose die Clearance der BKV-Replikation betreffend vergesellschaftet ist, auch wenn das Signifikanzniveau nicht erreicht wurde. Sicherlich sind größere Patientenzahlen notwendig, um die prognostische Relevanz der Kopienzahlen im Plasma für das Transplantatüberleben abschließend zu klären. Angesichts der niedrigen Inzidenz ist dies jedoch nur durch eine multizentrische Studie zu erreichen.

Auffällig ist, dass die hier untersuchten therapeutischen Ansätze einige Zeit benötigen um eine „Clearance“ der Virämie zu erreichen. Im Median dauerte es

bis zur negativen BK-PCR 106 Tage. Eine vergleichbare aktuelle Studie aus Kanada konnte anhand von 24 nierentransplantierten Patienten eine mediane Dauer bis zur Clearance der Virämie von 266 Tagen verzeichnen. Dort wurde als therapeutische Intervention eine alleinige Reduktion der immunsuppressiven Therapie vorgenommen (Simard-Meilleur et al., 2017). Dies zeigt, dass die zusätzliche Gabe von Cidofovir den Prozess der Clearance beschleunigen kann. Die vergleichbaren Studien von Kuypers et al. hatten sich primär auf den Verlauf der Nierenfunktion bzw. eine Stabilisierung der Transplantatfunktion konzentriert. Es zeigte sich dort ein langsamer Abfall der BK-Virämie über viele Monate, bis zum Studienabschluss (72 Monate) betrug die mediane Virämie jedoch noch $1,93 \pm 2,83$ log Kopien/ml. Somit ist kein direkter Vergleich mit dem hier untersuchten Kollektiv möglich.

Obwohl eine Stabilisierung der Transplantatfunktion sicherlich das entscheidende Ziel ist, kann bei dem Kollektiv der nierentransplantierten Patienten die Nierenfunktion, gemessen am Serum-Kreatinin und der eGFR, durch sehr viele Nebenfaktoren beeinflusst werden. So ist beispielsweise bereits bei einem supratherapeutischen Immunsuppressivspiegel eines Calcineurininhibitors (Tacrolimus, CsA), aufgrund des vasokonstriktorisches Effektes dieser Substanzklasse, eine akute, jedoch potentielle reversible Transplantatfunktionsverschlechterung zu erwarten. Dies spiegelt jedoch nicht zwingend eine dauerhafte Transplantatfunktionsverschlechterung wider, erschwert jedoch die Einschätzung des Erfolges der therapeutischen Interventionen bezüglich der PVAN alleinig anhand der Retentionswerte. Dies ist vor allem problematisch, da bis zum Erreichen einer Remission im Sinne einer negativen Plasma-PCR hier am Tübinger Kollektiv im Median 106 Tage benötigt wurden. Die Wahrscheinlichkeit einer Beeinflussung der Transplantatfunktion durch Co-Faktoren (Rejektion, Infektion, kardiovaskuläre Komplikation, Immunsuppressivspiegel) in diesem Zeitraum ist nicht gering. Deshalb erscheint eine Beurteilung des Therapieerfolges anhand der BKV-Clearance valider. Gegebenenfalls sollte auch eine Verlaufsbiopsie der Transplantatniere zur Evaluation eines Therapieansprechens bzw. des Fibrosegrades erwogen werden.

Prognostisch scheint es relevant zu sein, die Diagnose einer PVAN bzw. BKV-Infektion frühzeitig zu stellen, da jede Form der therapeutischen Intervention einige Zeit bis zur BKV-Clearance benötigt. Findet sich zum Diagnosezeitpunkt jedoch bereits eine deutlich eingeschränkte Nierenfunktion, ist die Prognose hinsichtlich des Transplantatüberlebens schlechter. Dies konnte bereits in vielen Publikationen bestätigt werden und deckt sich mit den Erfahrungen aus der Kohorte des Transplantationszentrums Tübingen (Hirsch et al., 2013a, Knight et al., 2013). Da die Entwicklung einer PVAN jedoch nicht durch spezifische klinische Symptome kennzeichnet ist, sollte bei jedem unklaren Anstieg der Retentionswerte eine Diagnostik mittels quantitativer PCR und bei Unklarheit der Genese der Transplantatfunktionsverschlechterung eine Nierenbiopsie erfolgen. Ferner sollte insbesondere im ersten Jahr nach Transplantation die Empfehlung des Routinescreenings der KDIGO-Leitlinie eingehalten werden (KDIGO, 2009). Eine frühzeitige Erkennung ermöglicht eine zeitgerechte therapeutische Intervention und verbessert sicherlich die Prognose des Transplantatüberlebens.

Eine Limitation der hier präsentierten Daten ist sicherlich die begrenzte Patientenzahl mit 19 nierentransplantierten Patienten mit histologisch gesicherter PVAN. Ferner wurden keine Randomisierung für verschiedene therapeutische Konzepte und kein Vergleich mit einer Kontrollgruppe mit beispielsweise isolierter Reduktion der Immunsuppression durchgeführt. Da es sich um eine Fallserie handelt wurden keine geplanten Kontrolltermine nach der Intervention vorgegeben bzw. eingehalten. Stattdessen waren die Zeitpunkte der klinischen und laborchemischen Kontrollen nach Maßgabe der Einschätzung des behandelnden Arztes erfolgt. Die Stärke der hier dargestellten Untersuchung ist hingegen das konsequente therapeutische Vorgehen, welches bei sämtlichen Patienten nach einem einheitlichen Therapieregime durchgeführt wurde. Hervorzuheben ist außerdem der lange Nachbeobachtungszeitraum von im Median 4 Jahren.

Die dargestellten Daten zeigen, dass unter dem therapeutischen Vorgehen bestehend aus der Kombination der Verabreichung von Cidofovir und der Umstellung auf eine mTOR-basierte Immunsuppression ein sehr gutes

Ergebnis bezüglich der Clearance einer BK-Virämie und des Transplantatüberlebens, auch bei hochgradig eingeschränkter Transplantatfunktion, unter limitierter Toxizität möglich ist.

5 SCHLUSSFOLGERUNG

Die Auswertung der hier am Transplantationzentrum Tübingen untersuchten 19 nierentransplantierten Patienten mit histologisch gesicherter PVAN konnte zeigen, dass der hier verfolgte therapeutische Ansatz bestehend aus einer virusspezifischen Therapie mit Applikation von „low-dose“ Cidofovir (0,25 mg/kg KG) und Umstellung auf eine mTOR-basierte Immunsuppression eine effektive und nebenwirkungsarme Therapie der PVAN darstellt. Die Verabreichung nach dem „Tübinger Cidofovir Protokoll“ ermöglicht einen breiten Einsatz selbst bei deutlich eingeschränkter Nierenfunktion. Effektivität und Anwendbarkeit stellen ein Alleinstellungsmerkmal des entwickelten Therapiekonzeptes dar.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Manifestation einer Polyomavirus-assoziierten Nephropathie stellt ein relevantes Risiko für die Transplantatfunktion nach Nierentransplantation dar. Die Prävalenz einer PVAN liegt im Mittel bei ca. 5% mit einer hohen Rate an Transplantatverlusten. Bei einem positiven Nachweis einer BK-Virämie sollte leitliniengerecht die immunsuppressive Therapie reduziert werden. Bei Patienten mit histologisch gesicherter PVAN oder bereits etablierter Transplantatfunktionsverschlechterung erscheint ein darüber hinausgehendes Therapieregime sinnvoll.

Am Transplantationszentrum Tübingen wird seit ca. 10 Jahren ein therapeutisches Vorgehen mit niedrig dosiertem Cidofovir (0,25 mg/kg KG) zusammen mit einer Umstellung auf eine mTOR-basierte Immunsuppression verfolgt. Über die vergangenen 10 Jahre wurden anhand dieses Regimes 19 Patienten mit histologisch gesicherter PVAN behandelt.

Im Median kam es 268 Tage nach Nierentransplantation zur Diagnosestellung einer PVAN. Sämtliche Patienten wurden auf eine mTOR basierte Immunsuppression umgestellt. Lediglich bei 4 Patienten musste der mTOR-Inhibitor im Verlauf rückumgestellt werden. Bei 53% der Patienten war eine einmalige Verabreichung von Cidofovir anhand des „Tübinger Cidofovir Protokolls“ ausreichend, wohingegen bei 37% bzw. 10% zwei- bzw. dreimalig Cidofovir verabreicht wurde. Durch dieses therapeutische Vorgehen konnte bei 79 % der Patienten eine Remission, gekennzeichnet durch eine Negativität der BKV-PCR, erreicht werden. Die mediane Dauer bis zur BKV-Clearance betrug 106 Tage [IQR 78-222 Tage] und ist somit kürzer als in vergleichbaren Studien mit alleiniger Reduktion der Immunsuppression. Von den 19 Patienten hatten 12 Patienten die Transplantatfunktion im Nachbeobachtungszeitraum ohne Dialysepflichtigkeit erhalten. Lediglich 2 Patienten verzeichneten ein Transplantatversagen bedingt durch die PVAN. Die restlichen 5 Patienten entwickelten das Transplantatversagen nicht im Zusammenhang mit der PVAN. Unter der Verabreichung von Cidofovir nach dem hier verwendeten Protokoll kam es zu keinen nachweislichen Nebenwirkungen, insbesondere zu keiner

relevanten Nephrotoxizität. Die Verabreichung von Cidofovir war selbst bei höhergradig eingeschränkter Nierenfunktion komplikationslos möglich.

Die Kombination aus low-dose Cidofovir und einer mTOR-basierten Immunsuppression stellt somit eine erfolgreiche therapeutische Intervention bei PVAN dar, die eine frühzeitige Clearance der BK-Virämie und eine Stabilisierung der Transplantatfunktion bei einem hohen Anteil der Patienten erlaubt. Dies stellt ein Alleinstellungsmerkmal gegenüber alternativer Therapiekonzepte dar.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- ALI, S. H., CHANDRAKER, A. & DECAPRIO, J. A. 2007. Inhibition of Simian virus 40 large T antigen helicase activity by fluoroquinolones. *Antivir Ther*, 12, 1-6.
- ANDREI, G., SNOECK, R., VANDEPUTTE, M. & DE CLERCQ, E. 1997. Activities of various compounds against murine and primate polyomaviruses. *Antimicrob Agents Chemother*, 41, 587-93.
- ARAKI, K., TURNER, A. P., SHAFFER, V. O., GANGAPPA, S., KELLER, S. A., BACHMANN, M. F., LARSEN, C. P. & AHMED, R. 2009. mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation. *Nature*, 460, 108-12.
- BINET, I., NICKELEIT, V., HIRSCH, H. H., PRINCE, O., DALQUEN, P., GUDAT, F., MIHATSCH, M. J. & THIEL, G. 1999. Polyomavirus disease under new immunosuppressive drugs: a cause of renal graft dysfunction and graft loss. *Transplantation*, 67, 918-22.
- BOHL, D. L., STORCH, G. A., RYSCHKEWITSCH, C., GAUDREAU-KEENER, M., SCHNITZLER, M. A., MAJOR, E. O. & BRENNAN, D. C. 2005. Donor origin of BK virus in renal transplantation and role of HLA C7 in susceptibility to sustained BK viremia. *Am J Transplant*, 5, 2213-21.
- BRESSOLLETTE-BODIN, C., COSTE-BUREL, M., HOURMANT, M., SEBILLE, V., ANDRE-GARNIER, E. & IMBERT-MARCILLE, B. M. 2005. A prospective longitudinal study of BK virus infection in 104 renal transplant recipients. *Am J Transplant*, 5, 1926-33.
- BUEHRIG, C. K., LAGER, D. J., STEGALL, M. D., KREPS, M. A., KREMERS, W. K., GLOOR, J. M., SCHWAB, T. R., VELOSA, J. A., FIDLER, M. E., LARSON, T. S. & GRIFFIN, M. D. 2003. Influence of surveillance renal allograft biopsy on diagnosis and prognosis of polyomavirus-associated nephropathy. *Kidney Int*, 64, 665-73.
- CELIK, B., SHAPIRO, R., VATS, A. & RANDHAWA, P. S. 2003. Polyomavirus allograft nephropathy: sequential assessment of histologic viral load, tubulitis, and graft function following changes in immunosuppression. *Am J Transplant*, 3, 1378-82.
- CHEN, Q., ZHENG, H. Y., ZHONG, S., IKEGAYA, H., HE, H. X., WEI, W., HE, Y. Y., KOBAYASHI, N., HONJO, T., TAKASAKA, T., TAKAHASHI, S., KITAMURA, T. & YOGO, Y. 2006. Subtype IV of the BK polyomavirus is prevalent in East Asia. *Arch Virol*, 151, 2419-29.
- CHESTERS, P. M., HERITAGE, J. & MCCANCE, D. J. 1983. Persistence of DNA sequences of BK virus and JC virus in normal human tissues and in diseased tissues. *J Infect Dis*, 147, 676-84.
- CUNDY, K. C., LI, Z. H. & LEE, W. A. 1996. Effect of probenecid on the distribution, metabolism, and excretion of cidofovir in rabbits. *Drug Metab Dispos*, 24, 315-21.
- DHARNIDHARKA, V. R., CHERIKH, W. S. & ABBOTT, K. C. 2009. An OPTN analysis of national registry data on treatment of BK virus allograft nephropathy in the United States. *Transplantation*, 87, 1019-26.

- DRACHENBERG, C. B., HIRSCH, H. H., PAPADIMITRIOU, J. C., GOSERT, R., WALI, R. K., MUNIVENKATAPPA, R., NOGUEIRA, J., CANGRO, C. B., HARIRIAN, A., MENDLEY, S. & RAMOS, E. 2007. Polyomavirus BK versus JC replication and nephropathy in renal transplant recipients: a prospective evaluation. *Transplantation*, 84, 323-30.
- DRACHENBERG, C. B., PAPADIMITRIOU, J. C., HIRSCH, H. H., WALI, R., CROWDER, C., NOGUEIRA, J., CANGRO, C. B., MENDLEY, S., MIAN, A. & RAMOS, E. 2004. Histological patterns of polyomavirus nephropathy: correlation with graft outcome and viral load. *Am J Transplant*, 4, 2082-92.
- ECKNER, R., LUDLOW, J. W., LILL, N. L., OLDREAD, E., ARANY, Z., MODJTAHEDI, N., DECAPRIO, J. A., LIVINGSTON, D. M. & MORGAN, J. A. 1996. Association of p300 and CBP with simian virus 40 large T antigen. *Mol Cell Biol*, 16, 3454-64.
- EGLI, A., INFANTI, L., DUMOULIN, A., BUSER, A., SAMARIDIS, J., STEBLER, C., GOSERT, R. & HIRSCH, H. H. 2009a. Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors. *J Infect Dis*, 199, 837-46.
- EGLI, A., KOHLI, S., DICKENMANN, M. & HIRSCH, H. H. 2009b. Inhibition of polyomavirus BK-specific T-Cell responses by immunosuppressive drugs. *Transplantation*, 88, 1161-8.
- FARASATI, N. A., SHAPIRO, R., VATS, A. & RANDHAWA, P. 2005. Effect of leflunomide and cidofovir on replication of BK virus in an in vitro culture system. *Transplantation*, 79, 116-8.
- FUNK, G. A., GOSERT, R., COMOLI, P., GINEVRI, F. & HIRSCH, H. H. 2008. Polyomavirus BK replication dynamics in vivo and in silico to predict cytopathology and viral clearance in kidney transplants. *Am J Transplant*, 8, 2368-77.
- GABARDI, S., WAIKAR, S. S., MARTIN, S., ROBERTS, K., CHEN, J., BORGI, L., SHEASHAA, H., DYER, C., MALEK, S. K., TULLIUS, S. G., VADIVEL, N., GRAFALS, M., ABDI, R., NAJAFIAN, N., MILFORD, E. & CHANDRAKER, A. 2010. Evaluation of fluoroquinolones for the prevention of BK viremia after renal transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol*, 5, 1298-304.
- GARDNER, S. D., FIELD, A. M., COLEMAN, D. V. & HULME, B. 1971. New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet*, 1, 1253-7.
- GARDNER, S. D., MACKENZIE, E. F., SMITH, C. & PORTER, A. A. 1984. Prospective study of the human polyomaviruses BK and JC and cytomegalovirus in renal transplant recipients. *J Clin Pathol*, 37, 578-86.
- GERITS, N. & MOENS, U. 2012. Agnoprotein of mammalian polyomaviruses. *Virology*, 432, 316-26.
- GOMEZ-LORENZO, M. G., VALLE, M., FRANK, J., GRUSS, C., SORZANO, C. O., CHEN, X. S., DONATE, L. E. & CARAZO, J. M. 2003. Large T antigen on the simian virus 40 origin of replication: a 3D snapshot prior to DNA replication. *EMBO J*, 22, 6205-13.

- GOUDSMIT, J., WERTHEIM-VAN DILLEN, P., VAN STRIEN, A. & VAN DER NOORDAA, J. 1982. The role of BK virus in acute respiratory tract disease and the presence of BKV DNA in tonsils. *J Med Virol*, 10, 91-9.
- GROSS, L. 1953. A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. *Proc Soc Exp Biol Med*, 83, 414-21.
- HIRSCH, H. H., BRENNAN, D. C., DRACHENBERG, C. B., GINEVRI, F., GORDON, J., LIMAYE, A. P., MIHATSCH, M. J., NICKELEIT, V., RAMOS, E., RANDHAWA, P., SHAPIRO, R., STEIGER, J., SUTHANTHIRAN, M. & TROFE, J. 2005. Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analyses and recommendations. *Transplantation*, 79, 1277-86.
- HIRSCH, H. H., KNOWLES, W., DICKENMANN, M., PASSWEG, J., KLIMKAIT, T., MIHATSCH, M. J. & STEIGER, J. 2002. Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients. *N Engl J Med*, 347, 488-96.
- HIRSCH, H. H., RANDHAWA, P. & PRACTICE, A. S. T. I. D. C. O. 2009. BK virus in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant*, 9 Suppl 4, S136-46.
- HIRSCH, H. H., RANDHAWA, P. & PRACTICE, A. S. T. I. D. C. O. 2013a. BK polyomavirus in solid organ transplantation. *Am J Transplant*, 13 Suppl 4, 179-88.
- HIRSCH, H. H. & STEIGER, J. 2003. Polyomavirus BK. *Lancet Infect Dis*, 3, 611-23.
- HIRSCH, H. H., VINCENTI, F., FRIMAN, S., TUNCER, M., CITTERIO, F., WIECEK, A., SCHEUERMANN, E. H., KLINGER, M., RUSS, G., PESCOVITZ, M. D. & PRESTELE, H. 2013b. Polyomavirus BK replication in de novo kidney transplant patients receiving tacrolimus or cyclosporine: a prospective, randomized, multicenter study. *Am J Transplant*, 13, 136-45.
- HIRSCH, H. H., YAKHONTOVA, K., LU, M. & MANZETTI, J. 2016. BK Polyomavirus Replication in Renal Tubular Epithelial Cells Is Inhibited by Sirolimus, but Activated by Tacrolimus Through a Pathway Involving FKBP-12. *Am J Transplant*, 16, 821-32.
- IMPERIALE MJ, M. E. 2007. *Fields Virology, 5th ed*, Lippincott Williams & Wilkins.
- JOSEPHSON, M. A., GILLEN, D., JAVAID, B., KADAMBI, P., MEEHAN, S., FOSTER, P., HARLAND, R., THISTLETHWAITE, R. J., GARFINKEL, M., ATWOOD, W., JORDAN, J., SADHU, M., MILLIS, M. J. & WILLIAMS, J. 2006. Treatment of renal allograft polyoma BK virus infection with leflunomide. *Transplantation*, 81, 704-10.
- KDIGO 2009. KDIGO Clinical Practice Guideline for the Care of Kidney Transplant Recipients. *Viral Diseases*.
- KNIGHT, D. A., HEJMANOWSKI, A. Q., DIERKSHEIDE, J. E., WILLIAMS, J. W., CHONG, A. S. & WALDMAN, W. J. 2001. Inhibition of herpes simplex virus type 1 by the experimental immunosuppressive agent leflunomide. *Transplantation*, 71, 170-4.

- KNIGHT, R. J., GABER, L. W., PATEL, S. J., DEVOS, J. M., MOORE, L. W. & GABER, A. O. 2013. Screening for BK viremia reduces but does not eliminate the risk of BK nephropathy: a single-center retrospective analysis. *Transplantation*, 95, 949-54.
- KNOLL, G. A., HUMAR, A., FERGUSON, D., JOHNSTON, O., HOUSE, A. A., KIM, S. J., RAMSAY, T., CHASSE, M., PANG, X., ZALTZMAN, J., COCKFIELD, S., CANTAROVICH, M., KARPINSKI, M., LABEL, L. & GILL, J. S. 2014. Levofloxacin for BK virus prophylaxis following kidney transplantation: a randomized clinical trial. *JAMA*, 312, 2106-14.
- KNOWLES, W. A., PIPKIN, P., ANDREWS, N., VYSE, A., MINOR, P., BROWN, D. W. & MILLER, E. 2003. Population-based study of antibody to the human polyomaviruses BKV and JCV and the simian polyomavirus SV40. *J Med Virol*, 71, 115-23.
- KRUMBHOLZ, A., ZELL, R., EGERER, R., SAUERBREI, A., HELMING, A., GRUHN, B. & WUTZLER, P. 2006. Prevalence of BK virus subtype I in Germany. *J Med Virol*, 78, 1588-98.
- KUYPERS, D. R., BAMMENS, B., CLAES, K., EVENEPOEL, P., LERUT, E. & VANRENTERGHEM, Y. 2009. A single-centre study of adjuvant cidofovir therapy for BK virus interstitial nephritis (BKVIN) in renal allograft recipients. *J Antimicrob Chemother*, 63, 417-9.
- KUYPERS, D. R., VANDOOREN, A. K., LERUT, E., EVENEPOEL, P., CLAES, K., SNOECK, R., NAESSENS, L. & VANRENTERGHEM, Y. 2005. Adjuvant low-dose cidofovir therapy for BK polyomavirus interstitial nephritis in renal transplant recipients. *Am J Transplant*, 5, 1997-2004.
- LEA, A. P. & BRYSON, H. M. 1996. Cidofovir. *Drugs*, 52, 225-230; discussion 231.
- LEE, B. T., GABARDI, S., GRAFALS, M., HOFMANN, R. M., AKALIN, E., ALJANABI, A., MANDELROT, D. A., ADEY, D. B., HEHER, E., FAN, P. Y., CONTE, S., DYER-WARD, C. & CHANDRAKER, A. 2014. Efficacy of levofloxacin in the treatment of BK viremia: a multicenter, double-blinded, randomized, placebo-controlled trial. *Clin J Am Soc Nephrol*, 9, 583-9.
- LEUNG, A. Y., CHAN, M. T., YUEN, K. Y., CHENG, V. C., CHAN, K. H., WONG, C. L., LIANG, R., LIE, A. K. & KWONG, Y. L. 2005. Ciprofloxacin decreased polyoma BK virus load in patients who underwent allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis*, 40, 528-37.
- MACKENZIE, E. F., POULDING, J. M., HARRISON, P. R. & AMER, B. 1978. Human polyoma virus (HPV)--a significant pathogen in renal transplantation. *Proc Eur Dial Transplant Assoc*, 15, 352-60.
- MATHUR, V. S., OLSON, J. L., DARRAGH, T. M. & YEN, T. S. 1997. Polyomavirus-induced interstitial nephritis in two renal transplant recipients: case reports and review of the literature. *Am J Kidney Dis*, 29, 754-8.
- MAYR, M., NICKELEIT, V., HIRSCH, H. H., DICKENMANN, M., MIHATSCH, M. J. & STEIGER, J. 2001. Polyomavirus BK nephropathy in a kidney transplant recipient: critical issues of diagnosis and management. *Am J Kidney Dis*, 38, E13.
- MENGEL, M., MARWEDEL, M., RADERMACHER, J., EDEN, G., SCHWARZ, A., HALLER, H. & KREIPE, H. 2003. Incidence of polyomavirus-

- nephropathy in renal allografts: influence of modern immunosuppressive drugs. *Nephrol Dial Transplant*, 18, 1190-6.
- MOENS, U., LUDVIGSEN, M. & VAN GHELUE, M. 2011. Human Polyomaviruses in Skin Diseases. *Pathology Research International*, 2011, 12.
- MOMPER, J. D., ZHAO, Y., SHAPIRO, R., SCHONDER, K. S., GAO, Y., RANDHAWA, P. S. & VENKATARAMANAN, R. 2013. Pharmacokinetics of low-dose cidofovir in kidney transplant recipients with BK virus infection. *Transpl Infect Dis*, 15, 34-41.
- NICKELEIT, V., HIRSCH, H. H., BINET, I. F., GUDAT, F., PRINCE, O., DALQUEN, P., THIEL, G. & MIHATSCH, M. J. 1999. Polyomavirus infection of renal allograft recipients: from latent infection to manifest disease. *J Am Soc Nephrol*, 10, 1080-9.
- NICKELEIT, V., HIRSCH, H. H., ZEILER, M., GUDAT, F., PRINCE, O., THIEL, G. & MIHATSCH, M. J. 2000a. BK-virus nephropathy in renal transplants-tubular necrosis, MHC-class II expression and rejection in a puzzling game. *Nephrol Dial Transplant*, 15, 324-32.
- NICKELEIT, V., KLIMKAIT, T., BINET, I. F., DALQUEN, P., DEL ZENERO, V., THIEL, G., MIHATSCH, M. J. & HIRSCH, H. H. 2000b. Testing for polyomavirus type BK DNA in plasma to identify renal-allograft recipients with viral nephropathy. *N Engl J Med*, 342, 1309-15.
- NICKELEIT, V., SINGH, H. K. & MIHATSCH, M. J. 2003. Polyomavirus nephropathy: morphology, pathophysiology, and clinical management. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 12, 599-605.
- PURIGHALLA, R., SHAPIRO, R., MCCAULEY, J. & RANDHAWA, P. 1995. BK virus infection in a kidney allograft diagnosed by needle biopsy. *Am J Kidney Dis*, 26, 671-3.
- RAMOS, E., DRACHENBERG, C. B., PAPADIMITRIOU, J. C., HAMZE, O., FINK, J. C., KLASSEN, D. K., DRACHENBERG, R. C., WILAND, A., WALI, R., CANGRO, C. B., SCHWEITZER, E., BARTLETT, S. T. & WEIR, M. R. 2002. Clinical course of polyoma virus nephropathy in 67 renal transplant patients. *J Am Soc Nephrol*, 13, 2145-51.
- RANDHAWA, P., PASTRANA, D. V., ZENG, G., HUANG, Y., SHAPIRO, R., SOOD, P., PUTTARAJAPPA, C., BERGER, M., HARIHARAN, S. & BUCK, C. B. 2015. Commercially available immunoglobulins contain virus neutralizing antibodies against all major genotypes of polyomavirus BK. *Am J Transplant*, 15, 1014-20.
- RANDHAWA, P. S., FINKELSTEIN, S., SCANTLEBURY, V., SHAPIRO, R., VIVAS, C., JORDAN, M., PICKEN, M. M. & DEMETRIS, A. J. 1999. Human polyoma virus-associated interstitial nephritis in the allograft kidney. *Transplantation*, 67, 103-9.
- RINALDO, C. H., GOSERT, R., BERNHOFF, E., FINSTAD, S. & HIRSCH, H. H. 2010. 1-O-hexadecyloxypropyl cidofovir (CMX001) effectively inhibits polyomavirus BK replication in primary human renal tubular epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother*, 54, 4714-22.
- ROLLISON, D. E., SEXTON, W. J., RODRIGUEZ, A. R., KANG, L. C., DANIEL, R. & SHAH, K. V. 2007. Lack of BK virus DNA sequences in most transitional-cell carcinomas of the bladder. *Int J Cancer*, 120, 1248-51.

- ROY, R., TROWBRIDGE, P., YANG, Z., CHAMPOUX, J. J. & SIMMONS, D. T. 2003. The cap region of topoisomerase I binds to sites near both ends of simian virus 40 T antigen. *J Virol*, 77, 9809-16.
- SCHOLD, J. D., REHMAN, S., KAYLE, L. K., MAGLIOCCA, J., SRINIVAS, T. R. & MEIER-KRIESCHE, H. U. 2009. Treatment for BK virus: incidence, risk factors and outcomes for kidney transplant recipients in the United States. *Transpl Int*, 22, 626-34.
- SENER, A., HOUSE, A. A., JEVIKAR, A. M., BOUDVILLE, N., MCALISTER, V. C., MUIRHEAD, N., REHMAN, F. & LUKE, P. P. 2006. Intravenous immunoglobulin as a treatment for BK virus associated nephropathy: one-year follow-up of renal allograft recipients. *Transplantation*, 81, 117-20.
- SHAH, K. V. Polyomaviruses. *Fields virology*
- SHAH, K. V. 2000. Human polyomavirus BKV and renal disease. *Nephrol Dial Transplant*, 15, 754-5.
- SIMARD-MEILLEUR, M. C., BODSON-CLERMONT, P., ST-LOUIS, G., PAQUET, M. R., GIRARDIN, C., FORTIN, M. C., CARDINAL, H., HEBERT, M. J., LEVESQUE, R. & RENOULT, E. 2017. Stabilization of renal function after the first year of follow-up in kidney transplant recipients treated for significant BK polyomavirus infection or BK polyomavirus-associated nephropathy. *Transpl Infect Dis*.
- STEWART, S. E., EDDY, B. E., GOCHENOUR, A. M., BORGESSE, N. G. & GRUBBS, G. E. 1957. The induction of neoplasms with a substance released from mouse tumors by tissue culture. *Virology*, 3, 380-400.
- TAKASAKA, T., GOYA, N., TOKUMOTO, T., TANABE, K., TOMA, H., OGAWA, Y., HOKAMA, S., MOMOSE, A., FUNYU, T., FUJIOKA, T., OMORI, S., AKIYAMA, H., CHEN, Q., ZHENG, H. Y., OHTA, N., KITAMURA, T. & YOGO, Y. 2004. Subtypes of BK virus prevalent in Japan and variation in their transcriptional control region. *J Gen Virol*, 85, 2821-7.
- TEDESCO SILVA, H., JR., CIBRIK, D., JOHNSTON, T., LACKOVA, E., MANGE, K., PANIS, C., WALKER, R., WANG, Z., ZIBARI, G. & KIM, Y. S. 2010. Everolimus plus reduced-exposure CsA versus mycophenolic acid plus standard-exposure CsA in renal-transplant recipients. *Am J Transplant*, 10, 1401-13.
- VALLS, E., DE LA CRUZ, X. & MARTINEZ-BALBAS, M. A. 2003. The SV40 T antigen modulates CBP histone acetyltransferase activity. *Nucleic Acids Res*, 31, 3114-22.
- VINCENTI, F., FRIMAN, S., SCHEUERMANN, E., ROSTAING, L., JENSSEN, T., CAMPISTOL, J. M., UCHIDA, K., PESCOVITZ, M. D., MARCHETTI, P., TUNCER, M., CITTERIO, F., WIECEK, A., CHADBAN, S., EL-SHAHAWY, M., BUDDE, K., GOTO, N. & INVESTIGATORS, D. 2007. Results of an international, randomized trial comparing glucose metabolism disorders and outcome with cyclosporine versus tacrolimus. *Am J Transplant*, 7, 1506-14.
- VITTECOQ, D., DUMITRESCU, L., BEAUFILS, H. & DERAY, G. 1997. Fanconi syndrome associated with cidofovir therapy. *Antimicrob Agents Chemother*, 41, 1846.

- YEN, C. L., TIAN, Y. C., WU, H. H., WENG, C. H., CHEN, Y. C., TU, K. H., LIU, S. H., LEE, C. C., LAI, P. C., FANG, J. T., HUNG, C. C., YANG, C. W. & LI, Y. J. 2016. Conversion to mTOR-inhibitors with calcineurin inhibitor elimination or minimization reduces urinary polyomavirus BK load in kidney transplant recipients. *J Formos Med Assoc*, 115, 539-46.
- ZHONG, S., YOGO, Y., OGAWA, Y., OSHIRO, Y., FUJIMOTO, K., KUNITAKE, T., ZHENG, H. Y., SHIBUYA, A. & KITAMURA, T. 2007. Even distribution of BK polyomavirus subtypes and subgroups in the Japanese Archipelago. *Arch Virol*, 152, 1613-21.

8 ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL DER DISSERTATIONSSCHRIFT

Die Arbeit wurde in der Medizinischen Klinik IV in der Sektion für Nieren- und Hochdruckerkrankungen unter Betreuung von Prof. Dr. Nils Heyne durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. Dr. Nils Heyne und PD Dr. Martina Guthoff. Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich unter Unterstützung meines Betreuers Prof. Dr. Nils Heyne.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen am 08.05.2018

Thomas Mühlbacher