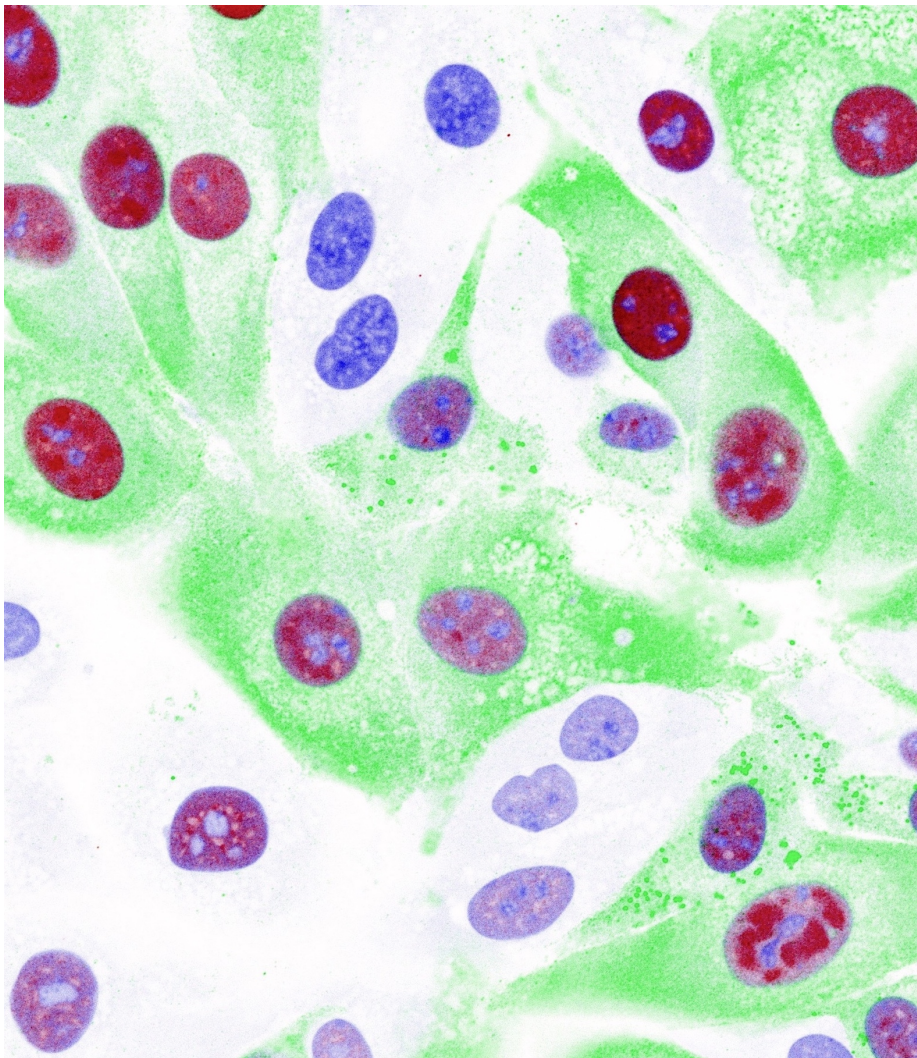


En *in vitro*-studie av antiviral effekt av cidofovirderivatet ODBG-CDV mot BK polyomavirus-replikasjon

—
Magnus Bjørgan Bjørkøy

Veileder: Christine Hanssen Rinaldo, avdeling for mikrobiologi og smittevern,
UNN Tromsø

Masteroppgave i MED-3950, Medisin profesjonsstudium, juni 2017



Forsidebilde: BK polyomavirus-infiserte primære humane nyreepitelceller tre dager etter infeksjon, behandlet med 0,1 μ M ODBG-CDV. Bildet har jeg fått hjelp av Stian Henriksen til å ta med konfokalmikroskop. Rødt og grønt representerer henholdsvis LTag og agnoprotein, to virale proteiner, mens blått viser cellulært DNA.

Forord

Denne oppgaven er en del av profesjonsutdanningen i medisin. Da jeg begynte å lete etter et tema for masteroppgave høsten 2015 tenkte jeg at det hadde vært spennende å jobbe med basalfag og lære om arbeid cellelaborarbeid. Jeg kom tidlig i kontakt med Christine Hanssen Rinaldo, professor ved Avdeling for mikrobiologi, som tilbød seg å være veileder for meg og foreslo tema for oppgaven. Hun foreslo spesialbioingeniør Stian Henriksen og overlege Garth Tylden som biveiledere, noe de begge to sa ja til.

Arbeidet har blitt utført på lab ved Avdeling for mikrobiologi og smittevern, UNN Tromsø, våren 2017 i tillegg til to uker høsten 2016 hvor jeg fikk opplæring i laborarbeid og vi gjennomførte en pilotgjennomgang av forsøkene.

Målet med denne oppgaven var å teste et lipidderivat av det antivirale medikamentet cidofovir, ODBG-CDV, på BK polyomavirus-infiserte primære humane nyreepitelceller i cellekultur. Denne lipidkonjugeringen har som hensikt å gi mulighet for peroral administrasjon og å bedre på nefrotoksisiteten til cidofovir. Vi ønsket å finne ut om dette medikamentet har potensiale til å hemme virusreplikasjon, uten at det dreper cellene. For å undersøke dette infiserte vi primære humane nyreepitelceller med polyomavirus BK. Deretter behandlet vi cellene med ODBG-CDV i ulike konsentrasjoner. Etter 2-4 dagers behandling brukte vi ulike målemetoder for å vurdere antiviral effekt og påvirkning på cellene.

Jeg vil rette en stor takk til Christine, Stian og Garth for at de har tatt seg så god tid til å gi meg helt uvurderlig og tålmodig hjelp og opplæring under laborarbeidet, og for veldig hjelpsomme kommentarer under arbeidet med oppgaveskrivingen, både helg og kveld. De har svart på masse spørsmål i denne perioden og har lært meg mye.

Magnus Bjørgan Bjørkøy, Tromsø juni 2017

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Forkortelser	IV
1 Sammenheng	V
2 Innledning	1
2.1 Virologisk bakgrunn	1
2.2 Epidemiologi.....	4
2.3 Polyomavirusassosiert nefropati.....	5
2.4 ODBG-CDV	8
3 Metode	9
3.1 Cellekultur	9
3.2 Infeksjon med BKPyV.....	9
3.3 Behandling med ODBG-CDV	10
3.4 Undersøkelser av celleviabilitet.....	11
3.5 Undersøkelser av virusreplikasjon.....	12
3.6 Bearbeiding av resultater	15
4 Resultater	16
4.1 Effekt av ODBG-CDV-CDV på celleviabilitet	16
4.2 Effekt av ODBG-CDV på BKPyV-replikasjon.....	21
4.3 Beregning av EC ₉₀ og CC ₉₀	29
5 Diskusjon	31
6 Konklusjon	35
7 Referanseliste	36
Figurliste	39
Tabelliste	39
Vedlegg	39
GRADE: Observations on the use of CDV for BK virus infection in renal transplantation.....	i
GRADE: Screening for BK viremia reduces but does not eliminate the risk of BK Nephropathy: A single-center retrospective analysis.....	ii
GRADE: Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors.....	iii
GRADE: CDV inhibits polyomavirus BK replication in human renal tubular cells downstream of viral early gene expression.	iv
GRADE: Polyomavirus BK replication dynamics <i>in vivo</i> and <i>in silico</i> to predict cytopathology and viral clearance in kidney transplants.	v
GRADE: 1-O-Hexadexloxypropyl CDV (CMX001) effectively inhibits polyomavirus BK replication in primary human renal tubular epithelial cells.	vi

Forkortelser

BKPyV	BK Polyomavirus
BO	Buffer only; behandling uten medikament, kun buffer
CDV	Cidofovir
CMV	Cytomegalovirus
EC50/EC90	Den konsentrasjonen som inhiberer virusreplikasjon med 50%/90%
EVGR	Early viral gene region
GAPDH	Glyceraldehyd 3-fosfat-dehydrogenase
gEq	Genomekvivalenter
HSV1&2	Herpes simplex virus 1 & 2
CC ₅₀ /CC ₉₀	Den konsentrasjonen som gir 50/90% cytotoksisitet/metabolismereduksjon
JCPyV	JC Polyomavirus
LTag	Large tumor antigen
LVGR	Late viral gene region
MCPyV	Merkel cell Polyomavirus
Mock-infisert	Uinfiserte celler som ellers er behandlet likt som infiserte celler.
MS	Multipel sklerose
NCCR	Non-coding control region
ODBG-CDV	1-O-octadecyl-2-O-benzyl- <i>sn</i> -glycero-3-CDV
PBS	Fosfatbufret natriumklorid
PyVAN	Polyomavirusassosiert nefropati
PyVHC	Polyomavirusassosiert hemorragisk cystitt
qPCR	Kvantitativ polymerase kjedereaksjon
RLU	Relative luminescent units
RPTEC	Renale proksimale tubulære epitelceller
SD	Standarddeviasjon
SI90/59	Selektivitetsindeks 50%/90%
sTag	Small tumor antigen
TBS	Tris-bufret natriumklorid
TBST	Tris-bufret natriumklorid med tween 20
TSPyV	Trichodysplasia spinulosa Polyomavirus
VZV	Varicella zoster virus

1 Sammendrag

Bakgrunn: Polyomavirus BK (BKPyV) infiserer omtrent 80% av befolkningen tidlig i livet og etablerer en livslang infeksjon. Viruset forårsaker sjeldent sykdom, men kan ved nyretransplantasjon reaktiveres og forårsake polyomavirusassosiert nefropati (PyVAN) med betydelig risiko for grafttap. Ingen effektive antivirale medikamenter mot BKPyV-infeksjoner finnes i dag. Cidofovir (CDV) har sporadisk blitt forsøkt som behandling mot PyVAN. Denne oppgaven undersøker *in vitro*-effekten av et lipidderivat av CDV, 1-*O*-octadecyl-2-*O*-benzyl-*sn*-glycero-3-cidofovir (ODBG-CDV) på BKPyV-infeksjon i primære humane nyreepitelceller (RPTEC).

Metode: RPTEC ble sådd ut og infisert med BKPyV, og to timer senere behandlet med ODBG-CDV i konsentrasjoner på 0,01 – 10 μM . 2, 3 og 4 dager post infeksjon (dpi) ble cellene høstet og undersøkt med kvantitativ polymerase kjedereaksjon (qPCR), immunfluorescensmikroskopi, konfokalmikroskopi og western blott. Vi undersøkte også effekten på celleviabilitet på uinfisert RPTEC ved hjelp av ATP-kvantifisering 3 dpi og kontinuerlig impedansmåling i cellelaget med xCelligence.

Resultater: Sammenlignet med ubehandlet RPTEC, viser resultatene at 0,1 μM ODBG-CDV reduserer frigjøringen av nydannet BKPyV med cirka 90% 3 dpi, og at høyere konsentrasjoner har enda mer effektiv antiviral effekt. Undersøkelsene viser at det spesielt er det sene proteinuttrykket av agnoprotein og VP1 som reduseres, med mindre påvirkning av det tidlige proteinet LTag. Viabilitetsmålinger viser at 0,1 μM ODBG-CDV gir ca 10% reduksjon i metabolisme, men at proliferasjon påvirkes lite. Ved konsentrasjoner fra 0,5 μM har ODBG-CDV en betydelig cytostatisk effekt og 10 μM ODBG-CDV gir betydelig celledød i løpet av kort tid.

Fortolkning: ODBG-CDV har en antiviral effekt mot BKPyV som er mange ganger så potent som CDV, og ser ut til kunne være mer potent enn andre CDV-derivat som brincidofovir. Cytotoksisk effekt er betydelig, men lave doser på rundt 0,1 μM ser ut til å tolereres relativt bra. ODBG-CDV kan være en kandidat for videre forskning på antiviral behandling av PyVAN.

2 Innledning

Humant polyomavirus BK (BKPyV) ble for første gang beskrevet i 1971 (1). Viruset ble oppdaget i urinen til en nyretransplantert pasient og fikk deretter navn etter pasientens initialer. BKPyV infiserer størsteparten av befolkningen allerede i ung alder og etablerer deretter det som mest sannsynlig er en livslang, lavgradig infeksjon i nyrer og urinveier. De fleste smittede vil aldri få kliniske konsekvenser av infeksjonen, men viruset kan reaktiveres ved immunsuppresjon, spesielt ved nyretransplantasjon og allogen beinmargtransplantasjon. Da vil viruset kunne øke sin replikasjon og forårsake sykdom. Sykdommene som hyppigst oppstår er polyomavirusassosiert nefropati (PyVAN) og ureterstenose hos henholdsvis 1-10% og 3% av nyretransplanterte, samt hemorragisk cystitt hos 5-15% av beinmargstransplanterte (2, 3). Det antivirale medikamentet cidofovir (CDV) brukes sporadisk mot disse infeksjonene, men spesifikk virkningsmekanisme mangler og evidensen er svak (4), og den mest effektive intervensjonen man har i dag er å redusere det immunsupprimerende medikamentregimet.

Økende alder på befolkningen, høy forekomst av diabetisk og hypertensiv nefropati, økende antall nyre- og beinmargstransplantasjoner og mer potente immunsuppressiva kan gjøre at slike opportunistiske infeksjonssykdommer som PyVAN blir et økende problem i fremtiden.

2.1 Virologisk bakgrunn

Polyomavirus er nakne virus med et kapsid bestående av proteinene VP1, VP2 og VP3. Av disse er det kun VP1 som vender mot utsiden; VP2 og VP3 sitter på innsiden av kapsidet. Viruspartikkelen består av 360 VP1-kopier, arrangert i 72 pentamerer. Hver pentamer består av fem VP1-molekyler, med ett molekyl av enten VP2 eller VP3 bundet sentralt (5, 6).

Som andre polyomavirus er BKPyV små virus (~45 nm), med dobbelttrådet, sirkulært DNA og et genom på rundt 5000 basepar. Genomet koder kun for noen få proteiner og deles opp i tre områder; non-coding control region (NCCR), early viral gene region (EVGR) og late viral gene region (EVGR). NCCR er området på genomet hvor replikasjonen starter og består av promotorer og regulerende elementer. EVGR er det området av genomet som uttrykkes før viral DNA-replikasjon finner sted, og består av gener som koder for large tumor antigen (LTAg), small tumor antigen (sTAg) og truncated tumor antigen (TruncTag). LVGR uttrykkes etter DNA-replikasjon, og koder for virale kapsidprotein; VP1, VP2 og VP3, samt agnoprotein (5, 6)

Rearrangeringer av NCCR forekommer når det har vært høy virusreplikasjon over tid, slik som ved aktiv sykdom eller i cellekultur. Dette gir et naturlig utvalg som fremmer virus med for eksempel duplikasjoner av deler av promotorregioner og gir høyere replikasjonshastighet (5). Virustypen som sirkulerer i befolkningen kalles arketype (7). I denne oppgaven brukte vi BKPyV Dunlop, et virus som opprinnelig var isolert fra urin men deretter ble passert i cellekultur (8). BKPyV Dunlop er kjent for å ha en høy replikasjonshastighet i cellekultur (9).

2.1.1 Replikasjonssyklus

BKPyV entrer vertscellen ved at kapsidproteinet VP1 binder til alfa-2,3-bundet sialinsyre på glykoproteiner eller til gangliosider på vertscellens overflate (10-12). Deretter tas viruset opp ved endocytose i caveoler og fraktes via cytoskjelettet til endoplasmatiske retikulum (10), hvor fjerning av kapsidet skjer (6). Deretter vil genomet entre cellekjernen, og transkripsjon kan etter hvert starte.

Studier har vist at det tar mellom 48 og 72 timer fra BKPyV infiserer en permissiv celle til første replikasjonssyklus er fullført. Uttrykk av tidlige gener (fra EVGR) starter 12 til 24 timer etter infeksjon (13).

Polyomavirus' replikasjonssyklus deles opp i et tidlig og et sent stadium. LTag uttrykkes i tidlig stadium, før replikasjon av virus-DNA finner sted, og uten dette proteinet vil ikke viruset kunne replikere DNA. Eksempler på effekter av LTag er helicaseaktivitet som tvinner opp det dobbelttrådede virale DNAet og rekruttering av humane proteiner nødvendig for DNA-replikasjon. Siden polyomavirus er avhengig av vertscellens apparat for DNA-syntese, har LTag i tillegg en svært viktig rolle i å få cellen til å entre celledyklus og unngå apoptose. Dette skjer blant annet via hemmingen LTag utøver på tumor suppressor-proteinene p53 og pRb (5). T-antigen-variantene sTag og TruncTag har fremdeles uavklarte roller i virusets replikasjon. Både LTag, sTag og TruncTag deler samme N-terminale del, men blir ved hjelp av alternativ spleising til tre ulike proteinprodukt.

Polyomavirus er i stor grad avhengig av vertscellens maskineri for DNA-syntese, RNA-transkripsjon og translasjon. Når vertscellen entrer S-fase replikeres også det virale DNA. BKPyV er altså avhengig av human DNA polymerase for replikasjon og koder ikke for egen DNA polymerase. Dette kompliserer utvikling av antivirale medikamenter ettersom typiske målproteiner for antiviral behandling mangler (14).

I sen fase av replikasjonssyklus, etter DNA-replikasjon, vil de sene proteinene fra LVGR transkriberes. VP1, VP2 og VP3 dannes i cytoplasma og fraktes til cellekjernen, hvor de

sammen med viralt DNA danner viruspartikler, også kalt virioner. Agnoprotein er et lite, multifunksjonelt protein som uttrykkes sent i replikasjonszyklus og finnes i cytoplasma. Proteinet har flere ulike funksjoner, og selv om det ikke er endelig kartlagt, virker det som om hovedfunksjonene til agnoprotein er knyttet til siste faser av virusets replikasjonszyklus og frigjøring av virus fra vertscellen. En annen mulig funksjon til agnoprotein er tilpasning av antall nye produserte virus, for eksempel for å unngå å drepe vertscellen eller for å unngå immunsystemet (15).

Hvordan BKPyV frigis fra vertscellen er enda ikke kartlagt. Flere andre polyomavirus spres ved lysering av vertscellen og dette er også hovedregelen for nakne virus, men det er usikkert om dette også gjelder BKPyV. For SV40 og JC polyomavirus (JCPyV), to virus som er nært beslektet til BKPyV, er det vist at henholdsvis VP4 og agnoprotein kan fungere som viroporin og tillate virusfrigjøring uten cellelysis (15). En studie fra Tromsø finner imidlertid ikke VP4, verken i BKPyV- eller SV40-infiserte celler, og viser at virus frigjøres like godt uten VP4 (16).

2.1.2 Polyomavirusfamilien

Det er hittil oppdaget 77 medlemmer av polyomavirusfamilien, og blant disse er det 13 man vet kan infisere mennesker (17). Polyomavirus er nært beslektet med hverandre og ligner mye med hensyn på genom, entring av vertsceller og replikasjonszyklus (5).

Av polyomavirusene er det kun BKPyV, JCPyV, Merkel Cell polyomavirus (MCPyV) og trichodysplasia spinulosa polyomavirus (TSPyV) som så langt er assosiert med sykdom hos mennesker.

JCPyV er nært beslektet til BKPyV, og ble som BKPyV oppdaget i 1971 (18). Den mest fremtredende sykdommen fremkalt av JCPyV er progressiv multifokal leukencefalopati (PML). Dette er en demyelinerende sykdom i hjernens hvite substans, og forekommer på samme måte som PyVAN og PyVHC etter immunosuppresjon, og da spesielt ved AIDS eller under immunomodulerende behandling med natalizumab mot multipel sklerose (MS) (19).

MCPyV er foreløpig det eneste av polyomavirusene som er sterkt assosiert med kreft hos mennesker. Viruset kan hos eldre og immunosupprimerte fremkalle den sjeldne men aggressive nevroendokrine hudkrefttypen Merkel celle-carcinom, og viruset har fått sitt navn etter denne sykdommen (20). TSPyV fører til hyperproliferasjon og forstørrelse av hårfollikler ved primærinfeksjon hos immunosupprimerte (21).

2.2 Epidemiologi

BKPyV infiserer størsteparten av befolkningen tidlig i livet, og innen voksen alder vil rundt 80% av befolkningen ha serologiske tegn på gjennomgått infeksjon (7, 22, 23). Man vet lite om de kliniske manifestasjonene av primærinfeksjon med BKPyV, antageligvis på grunn av subkliniske eller uspesifikke, influensa-lignende symptomer. En studie utført på 177 barn innlagt for luftveisinfeksjon (49% øvre luftveisinfeksjoner, 51% nedre luftveisinfeksjon), viste at 7 av disse serokonverterte til BKPyV i løpet av sykdomsforløpet som ved BKPyV-primærinfeksjon, og at alle disse 7 hadde symptomer på øvre luftveisinfeksjon (24). Ingen av pasientene som serokonverterte var immunsupprimerte. På grunn av assosiasjonen med symptomer på øvre luftveisinfeksjon, går man ut fra at smittevei er respiratorisk eller oral med dråpesmitte, men dette er ikke endelig klarlagt.

En metastudie konkluderer med at infeksjon vanligvis skjer i barndom; 65-90% av barn mellom 5 og 10 år vil være seropositive for BK-virus (25). En undersøkelse fra 1986 hvor man undersøkte blodprøver fra 461 individer i Tromsø med alder 0-82 år viste at 75% av barn 0-2 måneder gamle var positive for BKPyV-IgG (26). Dette falt til 24% i aldersgruppen 7-24 måneder, som var den aldersgruppen med lavest antall seropositive. Den høye andelen seropositive like etter fødsel reflekterer passiv IgG-overføring fra mor. Deretter steg andelen seropositive jevnt frem til 15-årsalder hvor omtrent 80% var seropositive. Dette samsvarer godt med andre studier, ser ikke ut til å ha endret seg over tid (7) og er likt i de fleste populasjoner verden rundt (25).

Det etableres hos de fleste en asymptomatisk, persisterende infeksjon i nyreepitel og urotel. Sykdom oppstår som regel ikke så lenge den smittede er immunkompetent. Likevel kan man også hos friske individer se at BKPyV i perioder reaktiveres og gir asymptomatiske, lave viruskonsentrasjoner i urin. 7% av friske individer hadde i en studie asymptomatisk BKPyV-utskillelse i urin, men ingen av de samme hadde BKPyV i blod, noe man regner som et tegn på sykdom (7).

Bortsett fra ved nyretransplantasjon, er det stort sett kun ved allogen hematopoietisk stamcelletransplantasjon man ser BKPyV-mediert sykdom (2). BKPyV-mediert sykdom utenfor nyrer og urinveier er svært sjeldent, på samme måte som at BKPyV-mediert sykdom hos immunkompetente er svært sjeldent.

2.3 Polyomavirusassosiert nefropati

BKPyV-reakivering følger en trinnvis modell hvor det tidligste tegnet er BKPyV skilt ut i økende mengder i urin, noe som ses hos 20-40% av nyretransplanterte (2). Noen viruriske pasientene vil progrediere til også å få BKPyV-viremi, totalt 1-20% av alle nyretransplanterte (27), som en tegn på utvikling av histologisk dokumenterbar PyVAN. PyVAN rammer 1-10% av nyretransplanterte pasienter (27, 28). Prospektive studier typer på at viruri forutgår viremi med median 4 uker, og biopsiverifisert PyVAN med 12 uker (29). Hos de som utvikler PyVAN vil mellom 10 og >80% kunne miste transplantatet selv med behandling, avhengig av hvor utbredte og uttalte forandringene i nyren er (2, 4). PyVAN er en av de viktigste årsaken til tap av den nyregraftet de to første årene etter transplantasjon (14, 29). Sykdommen opptrer nesten utelukkende i den transplanterte nyren, og kun unntaksvis i native nyrer. Den vanligste kliniske presentasjonsformen er asymptomatisk kreatininstigning, hvilket opptrer gjennomsnittlig 12-14 måneder etter transplantasjon, og differensialdiagnostikken opp mot avstøtningsreaksjon kan være utfordrende (30).

Hos pasienter over 60 år er det nå en større andel som må retransplanteres eller gå tilbake til dialyse på grunn av infeksjoner enn av avstøtning, en andel som er økende. Polyomavirus er den nest viktigste risikofaktor for graftsvikt etter urologiske komplikasjoner (31).

Nyrebiopsi regnes som gullstandard for diagnostisering av PyVAN. Man krever både bevis på organskade og virusreplikasjon (14). Histopatologisk kjennetegnes PyVAN av progredierende infiltrasjon av inflammasjonsceller, tubulusatrofi og fibrose. Cytopatiske effekter av virusinfeksjonen er nukleære inklusjonslegemer, forstørrede cellekjerner, celleavrunding, nekrotiske celler og avdekking av basalmembranen. Siden PyVAN har en flekkvis utbredelse i nyren, er det begrenset sensitivitet ved nyrebiopsi, og histopatologiske endringer alene er ikke patognomonisk (5, 29).

Ved reaktivering og høy replikasjon av viruset vil det skje en skade på basalmembranen, noe som gjør at tubulusfiltrat samles i nyreinterstitiet. Dette vil igjen kunne føre til interstitiell fibrose og tubulær atrofi, og utvikling av irreversibel nyresvikt (14).

Tall fra norsk nyremedisinsk forening viser at det i 2015 ble utført 253 nyretransplantasjoner i Norge, et antall som er svakt økende. I 2015 fantes det 3445 pasienter i Norge som levde med en transplantert nyre (32).

Man har klart å identifisere flere risikofaktorer for utvikling av PyVAN, men den absolutt viktigste virker å være det immunomodulerende medikamentregimet og hvordan dette er satt

sammen i form av dose og preparatvalg; både det å få en kombinasjon av tre ulike klasser immunsuppresiva og det å få kombinasjonen av takrolimus og mykfenolatmofetil, er assosiert med økt risiko for PyVAN (29, 33).

En annen risikofaktor ser ut til å være pasientens BKPyV-status; pasienter som ikke hadde tegn til BKPyV-infeksjon før nyretransplantasjon ser ut til å ha høyere risiko for å utvikle PyVAN (14). Dette forklares med at donornyren gjerne er infisert med BKPyV på grunn av den høye forekomsten i befolkningen, og at mottaker ikke har spesifikk immunitet mot viruset ettersom han er tidligere ueksponert for viruset. Likevel betyr ikke dette at seropositive pasienter er beskyttet mot PyVAN.

Risikostratifisering hos allerede nyretransplanterte gjøres i form av å screene for viruri eller viremi. Viruri har sensitivitet og negativ prediktiv verdi på tilnærmet 100%, slik at man hos mange pasienter kan utelukke PyVAN (14). Det anbefales å screene med urin-PCR eller urincytologi hver tredje måned de første to årene etter transplantasjon, og ved BKPyV $> 10^7$ kopier/ml i urin og $> 10^4$ kopier/ml i blod anbefales nyrebiopsi (29). På denne måten har man mulighet til å senke den immunmodulerende behandlingen før det har gått for lang tid, men dette kan føre til akutt avstøtningsreaksjon i 15%, noe som kan føre til tap av den transplanterte nyren hos en betydelig andel (30).

Funk et al. viste i 2008 ved hjelp av matematiske modeller at BKPyV i plasma ved aktiv viremi har svært rask halverings- og doblingstid, begge på 2-18 timer, noe som skulle bety at $> 99\%$ av BKPyV-mengden i plasma må erstattes hver dag for å vedlikeholde jevne virustiter (34). Videre viste de at PyVAN sannsynligvis starter med BKPyV-replikasjon i nyreepitel. Derfra vil infeksjonen spre seg til urotel og ved vesicouretral reflux vil nye områder av nyren infiseres. Det er derfor viktig ved PyVAN-behandling å få kontroll på BKPyV-replikasjon i urotel i urinledere og blære såvel som i epitel i nyren. Videre ble det kalkulert at for å få kontroll på infeksjonen, måtte BKPyV-replikasjon reduseres med minst 80%, noe som ville føre til at pasienten ble kvitt viremi på 7 uker, mens viruri ville vedvare > 14 uker. Helst burde BKPyV-replikasjon reduseres med 90% for å sikre raskere respons (34).

2.3.1 Behandling av PyVAN

Det finnes i dag ingen effektive antivirale medikamenter mot polyomavirusinfeksjoner. Behandlingen av PyVAN baserer seg stort sett på å redusere dosene immunsupprimerende medikamenter.

Det har i enkelte tilfeller blitt brukt CDV, leflunomide og fluorkinoloner basert på enkelte case-studier. Dette er medikamenter som er godkjent for andre sykdommer, men det finnes lite evidens for bruk mot BKPyV, de har mye bivirkninger og kun begrenset nytteverdi i pasientstudier (4).

2.3.2 Cidofovir (CDV)

I tillegg til å ha svak evidens er cidofovir (CDV) nefrotoksisk, og oppkonsentreres i tubulusepitel ved aktivt opptak, noe som kan være ekstra uheldig siden det er allerede nyresyke personer som trenger medikamentet i forbindelse med PyVAN. Samtidig kan dette være gunstig ved behandling av sykdommer i nettopp nyreepitel. CDV brukes i Norge med indikasjon på cytomegalovirusretinitt (CMV) hos AIDS-pasienter (35). Den viktigste virkningsmekanismen ved bruk på CMV og andre herpesvirus er hemming av viral DNA polymerase, et protein BKPyVs genom ikke koder for (14). Mye av effekten tilskrives derfor CDVs cytostatiske virkning, siden det også hemmer vertscellens replikasjon.

CDV er en cytidin-monofosfat-(CMP)-analog og omdannes intracellulært til den aktive metabolitten, CDV-difosfat, som inkorporeres i DNA istedenfor CTP og hemmer DNA-polymerase (35). Det er tidligere vist at CDV har en moderat *in vitro*-effekt på BKPyV, men at selektiviteten er lav, noe som vil si at også vertscellene påvirkes mye. Det er vist at 143 μM CDV reduserer ekstracellulært BKPyV-DNA med 90% i primære humane renale proksimale tubuliepiteliale celler (RPTEC) (EC_{90}) *in vitro* 3 dager etter infeksjon (dpi) sammenlignet med ubehandlede celler (13). Samtidig ser man betydelig hemming av vertscellens DNA-replikasjon og metabolske aktivitet, og det er rapportert at 260 μM CDV hemmer RPTECs vekst med 50% (CC_{50}) (36).

CDV må administreres intravenøst. På grunn av den lave lipidløseligheten, må stoffet transporteres aktivt inn i celler for å kunne utøve sin effekt. Dette utføres av en aniontransportør (hOAT1) som kun finnes i høye konsentrasjoner i nyrer (36). Noen av de vanligst rapporterte bivirkningene til CDV er lett til moderat leukopeni (25%), nøyttropeni (41%) og anemi (63%) (37).

2.3.3 Brincidofovir

Brincidofovir (tidligere kalt CMX001) er et lipid-konjugert derivat av CDV. Lipidhalen gir brincidofovir større fettløselighet enn CDV, noe som gir raskt opptak i alle celler og tillater peroral administrasjon (38).

Sammenlignet med ubehandlede celler, oppnådde man 3 dpi 90% reduksjon av ekstracellulær BKPyV-DNA-mengde (EC₉₀) med en brincidofovir-konsentrasjon på 0,31 µM 3 dpi *in vitro* i RPTEC (39). Dette er over 400 ganger lavere enn CDV-konsentrasjonen som kreves for å få tilsvarende effekt.

2.4 ODBG-CDV

I likhet med brincidofovir er 1-*O*-octadecyl-2-*O*-benzyl-*sn*-glycero-3-cidofovir (ODBG-CDV) et lipidkonjugert derivat av CDV med god biotilgjengelighet ved oral administrasjon. ODBG-CDV diffunderer inn i alle celler uten behov for aktive transportmekanismer (40, 41).

På grunn av at ODBG-CDV ikke tas aktivt opp i nyren slik CDV, er oppkonsentreringen i nyren mye mindre (40). Dette er heldig for ekstrarenale infeksjoner da nefrotoksistitet er den dosebegrensende bivirkningen til CDV. Ved PyVAN, en infeksjon som sitter i nyren, er det ikke nødvendigvis heldig å unngå oppkonsentrering. Likevel kan dette være gunstig da det er viktig å også undertrykke replikasjonen i urotel (34), og med CDV vil man kanskje ikke oppnådd høy nok konsentrasjon i urotelet fordi en så høy konsentrasjon ville skadet nyrene.

ODBG-CDV er tidligere utprøvd *in vivo* på mus som behandling mot dødelige doser av ectromeliavirus, et koppevirus som rammer mus (40). Forsøkene viste hvordan ODBG-CDV effektivt kunne kurere denne dødelige infeksjonen, at stoffet ikke oppkonsentreres hos i nyrene, at leverkonsentrasjonene er relativt lave, men at lungekonsentrasjonene er svært høye. Samtidig fikk man vist at oral biotilgjengelighet var god. EC₅₀ mot ectromeliavirus i cellekultur var på 0,01 µM, mens selektivitetsindeks (SI₅₀) var på 3500.

Williams-Aziz et al. prøvde i 2005 flere ulike CDV-analoger på en rekke ulike herpesvirus *in vitro* (42). De fant at mange av de lipidløselige CDV-analogene gjerne var 100-1000 ganger så potent antiviral behandling som CDV. ODBG-CDV hadde EC₅₀ på henholdsvis 100, 138 og 510 ganger lavere enn CDVs EC₅₀ mot varicella zoster virus (VZV), herpes simplex virus 1 (HSV1) og herpes simplex virus 2 (HSV2). EC₅₀ for humant cytomegalovirus var for flere virusstrains så lavt som 0,003 µM, 170 ganger mer aktivt enn CDV. Aktiviteten mot humant herpesvirus 8 og Epstein-Barr virus var også svært høy. IC₅₀ (50% reduksjon i proliferasjon) og CC₅₀ (50% celledød) for ODBG-CDV ble kalkulert til å være henholdsvis 4,8 og 16 µM i daudi-celler, og 3,3 og >100 µM i humane forhudsfibroblaster.

Hensikten med denne oppgaven var å undersøke om ODBG-CDV har antiviral effekt mot BKPyV i RPTEC, og å samtidig undersøke hvilken effekt ODBG-CDV har på cellene.

3 Metode

3.1 Cellekultur

Til forsøkene har det blitt brukt primære humane renale proksimale tubuliepiteliale celler (RPTEC) i passasje 3, kjøpt fra Lonza. Alle forsøkene ble utført på celler med lot nr. 362300, høstet fra en pasient 13. juni 2013. Produsenten oppgir at donor var en 53 år gammel kaukasisk kvinne. Screening for HIV, HBC, HBV og mycoplasma oppgis å være negativ.

Som vekstmedium har det til alle forsøkene blitt benyttet Renal Epithelial Cell Growth Medium (REGM) (Lonza), som anbefalt av celleleverandør. Dette inneholder ulike næringsstoffer, vekstfaktorer og antibiotika, samt 0,5% føtalt bovint serum.

Cellene ble oppbevart i rør á 250 000 celler/ml i flytende nitrogen, og hadde blitt tilsatt dimetyl sulfoxid (DMSO) som kryoprotektant før frysing. Til hvert forsøk ble cellene tint i vannbad ved 37°C. De ble deretter suspendert i 37°C REGM før de ble sådd ut to 25 cm² flasker. Én dag etter opptining ble supernatant sugd av og nytt REGM tilsatt. Tre til fire dager etter opptining ble cellene så tilsatt romtemperert trypsin for å få dem til å løsne fra underlaget, og cirka 2 minutter senere tilsatt trypsin neutralizing factor (TNS), før cellesuspensjonen ble sentrifugert i 5 minutter. Cellepellet ble så resuspendert i nytt REGM, og sådd ut med en konsentrasjon på 50 000 celler/ml, bortsett fra til xCelligence, hvor cellene ble sådd ut til en endelig konsentrasjon på 18 750 celler/ml. Forsøk til immunfluorescens, konfokalmikroskopi, qPCR og western blott ble sådd ut på 48-brønnersplater i 200 µl REGM (12 500 celler per brønn med areal 0,75 cm²). Celler til ATP-målinger ble sådd ut på 96-brønnerplater i 125 µl REGM (6250 celler per brønn med areal 0,32 cm²) og celler til xCelligence ble sådd ut på E-16-plater i 200 µl REGM (3750 celler per brønn med areal 0,2 cm²). Inkubasjonen foregikk i 37°C inkubator, med 5% CO₂ og luftfukter.

3.2 Infeksjon med BKPyV

Til alle infeksjonsforsøkene har det blitt brukt en supernatant fra BKPyV-infiserte Veroceller, som hadde vært infisert med BKPyV (Dunlop-stammen) i over 3 uker. Denne supernatanten ble blandet 1:1 med REGM. Vekstmediumet brukt på Verocellene var ulikt fra REGM, og for å forsikre like betingelser, ble våre negative kontrollgrupper tilsatt REGM og supernatant fra uinfiserte Veroceller i 1:1 blandingsforhold. Heretter vil de negative kontrollene bli omtalt som mock-infiserte celler.

Infeksjon ble utført én dag etter utsæd i cellebrett.

Supernatant ble fjernet fra cellene som skulle infiseres, før de ble tilsatt enten 100 µl virussuspensjon eller 100 µl mock-suspensjon. 2 timer etter infeksjon suges virusmedium av cellene, og cellene vaskes med isoton fosfatbufret NaCl (PBS) før de gis REGM med eller uten ODBG-CDV (se 3.3)

Trinn 1			Trinn 2		Trinn 3
Utgangskons.	Fortynning i buffer	Kons. i buffer A	Fortynning i medium	Kons. i medium B	Endelig kons. C
10 000µM ODBG-CDV-stock	Ufortynnet	10 000µM (= A1)	4µl A1 + 1996µl	20 µM (B1)	10 µM
10 000µM (A1)	5 µl A1 + 45 µl buffer	1000 µM (= A2)	4µl A2 + 1996µl	2 µM (B2)	1,0 µM
1000µM (A2)	25 µl A2 + 25 µl buffer	500 µM (= A3)	4µl A3 + 1996µl	1,0 µM (B3)	0,5 µM
1000µM (A2)	5 µl A2 + 45 µl buffer	100 µM (= A4)	4µl A4 + 1996µl	0,2 µM (B4)	0,1 µM
100µM (A4)	5µl A4 + 45 µl buffer	10 µM (= A5)	2µl A5 + 998 µl	0,02 µM (B5)	0,01 µM
Buffer	Ufortynnet	100% buffer (=A6)	5µl A6 + 2495µl	BO x 2 (B6)	BO

Tabell 1: Seriefortynning av ODBG-CDV. Fremgangsmåte for seriefortynning av ODBG-CDV for å forsikre lik konsentrasjon av buffer til alle ferdige fortynninger, samt for å forhindre at metanolkomponenten i bufferen fordampet. Merk at tredje fortynningstrinn utføres når medikamentet tilsettes i et forhold på 1:1 til REGM i cellebrønnen. BO = buffer only

3.3 Behandling med ODBG-CDV

ODBG-CDV-stockløsning ble tillaget fra tørrstoff og løst opp i en buffer bestående av metanol, vann og 30% ammoniumhydroksid i blandingsforhold 50/50/2. Det ble til første forsøk laget en stockløsning på 10 mM ODBG-CDV som ble oppbevart ved 4°C og deretter brukt til de kommende forsøkene. De endelige konsentrasjonene av medikamentet på 10 µM, 1 µM, 0,5 µM, 0,1 µM og 0,01 µM ble oppnådd ved seriefortynning. Etter utført seriefortynning ble ODBG-CDV først fortynnet i REGM (trinn 2), deretter 1:1 med REGM i cellebrønnen til endelig konsentrasjon (trinn 3), (**Tabell 1**). Fortynning ble utført samme dag som behandling for hvert forsøk. For å forhindre fordampning av metanolkomponenten i bufferen ble fortynningen utført på is. For å kontrollere for eventuelle antivirale eller cytopatiske effekter av metanolbufferen, inneholdt samtlige konsentrasjoner samme konsentrasjon av buffer. I tillegg til at noen paralleller kun fikk buffer og ikke noe medikament (ubehandlet), fikk en kontrollgruppe kun REGM og verken buffer eller medikament, for å kunne undersøke bufferens effekt på cellene.

3.4 Undersøkelser av celleviabilitet

Ettersom ODBG-CDV er en DNA-polymerasehemmer med potensielt svært sterke cellulære bivirkninger, var det viktig å undersøke medikamentets effekt på cellene.

3.4.1 Fasekontrastmikroskopi

Fasekontrastmikroskopi med 20X objektiv ble utført daglig etter infeksjon og behandling for å dokumentere celleproliferasjon og synlige cytopatiske effekter. Billedtaking og -behandling ble utført med Nikon TE2000 mikroskop med NIS Elements (Nikon Corporation), versjon 4 software.

3.4.2 xCelligence

xCelligence RTCA DP-system (ACEA Biosciences) måler impedans i bunnen av cellebrønnen i E-plater hvert 15. minutt ved hjelp av elektroder i bunnen av brønnene. Dette uttrykkes så som forholdstallet *celleindeks*. Man bruker dette som en dynamisk modell på celleviabilitet, cellestrømelse, proliferering og styrke på celleadhesjon til underlaget. Resultatene presenteres her på to ulike måter. Ved normalisert celleindeks er siste måling før behandling satt som nullpunkt og definert som likt for alle brønnene da de frem til dette tidspunktet hadde fått like forhold. Ved baselinje normalisert celleindeks er gjennomsnittet av celleindeks til de ubehandlede brønnene definert som 0, og videre utvikling viser relativ endring i forhold til ubehandlede brønner.

Brønnene på E-16-platene ble før forsøkene dekket med fibronectin i 5 minutter for å sikre bedre forhold for celleadhesjon. Fibronectin ble sugd av og brønnen ble vasket med PBS. Før utsåing av celler ble 125 µl REGM tilsatt hver brønn i E-16-platen og bakgrunnsimpedansen målt etter 30 minutter. Deretter ble 3750 celler/brønn sådd ut i E-16-plater i et totalt volum på 200 µl, med en konsentrasjon på 18 750 celler/ml. De ble så inkubert ved 37°C i xCelligence-systemet.

Ett døgn etter utsæd ble mediumet fjernet og erstattet med ODBG-CDV fortynnet i REGM i ulike konsentrasjoner og på nytt inkubert i opptil 5 dager. I noen av forsøkene skiftet vi cellemedium hver 24. time eller 72 timer etter behandling.

3.4.3 ATP-måling

ATP er et molekyl som finnes i levende celler og nivået ATP i en cellekultur er proporsjonalt med antall levende celler. For å kunne vurdere toksisiteten til ODBG-CDV på uinfiserte celler, utførte vi ATP-kvantifisering ved hjelp av CellTiter Glo (Promega). Tilsetning av CellTiter

Glo-reagenset fører til lysing av cellene og gir ved binding til ATP et luminescerende signal som er proporsjonalt til konsentrasjonen av ATP. Slik kunne vi sammenligne mengden metabolsk aktive celler mellom ulike behandlingsgrupper og sammenligne dette med ubehandlede celler. 3 dager etter behandling ble det tilsatt 100 µl CellTiter Glo-reagens til hver brønn med celler som allerede inneholdt 100 µl supernatant. Cellene ble så inkubert i 12 minutter for å stabilisere det luminescerende signalet, hvor de 2 første minuttene var på en ristepattform. Deretter ble luminescensmåling utført med Tecan Infinite F200PRO plateleser og resultatene registrert i programmet Magellan (Tecan).

For å kunne kvantifisere mengden ATP i prøvene og for å sjekke lineært område, lagde vi standardrekker med kjente ATP-konsentrasjoner. ATP-tørrestoff ble løst til en stockløsning på 90,7 mM som ble oppbevart ved -20°C. Deretter utførte vi seriefortynning til endelige konsentrasjoner 25 000 nM, 10 000 nM, 1000 nM, 500 nM, 250 nM, 100 nM, 10 nM og 1 nM. Standardkonsentrasjonene ble så tilsatt CellTiter-Glo reagens i et forhold på 1:1 og inkubert og analysert sammen prøvene.

3.5 Undersøkelser av virusreplikasjon

3.5.1 qPCR

Kvantitativ polymerase kjedereaksjon (qPCR) er en teknikk for å mangfoldiggjøre og kvantitere et stykke av DNA. qPCR ble utført for å kvantifisere mengden ekstracellulært viralt DNA i supernatanten. For å få en nullprøve, fire timer etter infeksjon, høstes 10 µl supernatant fra ubehandlede infiserte celler etter at virusinokulat er fjernet og nytt medium tilsatt. Deretter høstes supernatant fra infiserte og uinfiserte celler 3 dpi. I tillegg ble det i enkelte forsøk høstet til qPCR 2 og 4 dpi. Vi høstet fra to brett med infiserte celler, og slo to og to like paralleller fra samme brett sammen for å kunne undersøke gjennomsnittlig virusmengde i ett cellebrett. Prøvene ble deretter fortynnet 1:100 i AccuGene molekylært-gradert vann og kokt ved 100°C i 5 minutter. De ble så tilsatt primere og probe rettet mot BKPyV LTag. I hvert forsøk ble det utført analyse av to ulike cellebrett som hadde fått lik behandling. Hver av disse prøvene ble så fordelt på tre brønner for PCR. Det ble deretter regnet gjennomsnitt av hver tripplett, og standardavvik ble kalkulert på differensen mellom de to ulike cellebrettene. Kvantitering ble gjort ved tilsetning av BKPyV i kjente konsentrasjoner på 10 – 1 000 000 gEq/µl.

3.5.2 Immunfluorescensfarging og mikroskopi

Ved immunfluorescensfarging brukes fluoriserende antistoff til å detektere spesifikke cellulære eller virale proteiner i cellen. Vi har gjort en indirekte immunfluorescensfarging, hvor det er

sekundærantistoffene og ikke primærantistoffene som er fluorescerende. Før immunfluorescensfarging metanolfikseres cellene 1 dpi, 2 dpi, 3 dpi eller 4 dpi. De vaskes i PBS, inkuberes 10 minutter i 100% metanol og vaskes så to ganger med PBS. Cellene blokkeres først med 5% geitserum i PBS i 30 minutter. De tilsettes deretter primærantistoff, fortynnet i 1% geitserum i PBS (**Tabell 2**) og inkuberes i 30 minutter. Etter fire runder med PBS-vask tilsettes så sekundærantistoffer: Alexa 568nm geit anti-mus (rød) og Alexa 488nm geit anti-kanin (grønn), begge i fortynningsforhold 1:500 i 1% geitserum fortynnet i PBS, etterfulgt av fire nye runder med PBS-vask. Deretter farges cellulært DNA med DraQ5 (blå). Prøvene undersøkes så med samme mikroskop og software som beskrevet for fasekontrastmikroskopi.

Antistoffer brukt til immunfluorescensfarging:	Fortynning
Polyklonalt anti-agnoprotein (kanin) (Rinaldo et al., 1998 (43))	1: 1200
Monoklonalt anti-SV40 LTag N-terminal mAb (mus) (Ab-2 Calbiochem)	1: 50
Polyklonalt anti-VP1 (kanin) (Rinaldo et al., 2003 (44))	1: 1000
Monoklonalt anti-BKPyV VP1 (mus) (ViroStat)	1: 400
DraQ5 (Biostatus)	1: 1000
Antistoffer brukt til western blot	Fortynning
Polyklonalt anti-agnoprotein serum (kanin) (Rinaldo et al., 1998 (43))	1: 10 000
Polyklonalt anti-VP1 serum (kanin) (Rinaldo et al., 2003 (44))	1: 10 000
Polyklonalt anti-LTag N-terminal serum (kanin) (Hey et al., 1994 (45))	1: 2000
Monoklonalt anti-SV40 LTag N-terminal mAb (mus) (Ab-2 Calbiochem)	1: 500
Monoklonalt anti-glyceraldehyd 3-fosfat dehydrogenase (GAPDH) (mus) (ab8245, Abcam)	1: 2000

Tabell 2: Oversikt over primærantistoffer brukt til immunfluorescens og western blot

3.5.3 Konfokalmikroskopi

Konfokalmikroskopi er en billedtagningsmetode som gir bedre forstørrelse, oppløsning og dybdefokus enn konvensjonell lysmikroskopi. Det baserer seg på laserstråler som skanner området man ønsker bilde av, noe som i vårt tilfelle vil eksitere fluoroforene på sekundærantistoffene. Signalet går deretter gjennom et svært lite hull, noe som eliminerer lys som er ute av fokus. Siden bakgrunnslyset blir eliminert, kan man slik danne bilder som nærmest skaper tynne snitt av cellene, slik at man bedre kan studere intracellulære strukturer. Celler ble sådd ut i samme tetthet som i andre forsøk, med 50 000 celler/ml i 8 brønner på chamber slides. Før utsæd ble platene inkubert 5 minutter med fibronectin, før vi tilsatte PBS. PBS ble sugd av og cellesuspensjon tilsatt. Infeksjon og behandling ble utført som beskrevet under 3.2. Mock-infiserte celler som negativ kontroll ble behandlet med 0 μ M. Infiserte celler

ble tilsatt henholdsvis 0, 0,1 og 1,0 μ M ODBG-CDV. 3 dpi ble cellene fiksert med 10 minutters fiksering i 4% formalin. Like før farging ble cellene permeabilisert med 10 minutters metanolinkubering. Det ble benyttet samme antistoffkombinasjoner (**tabell 2**) og samme prosedyre for immunfluorescensfarging som beskrevet under 3.5.2.

3.5.4 Western blott

Western blot er en metode hvor man bruker proteinelektroforese til å separere proteiner basert på størrelse, hvor mindre proteiner vil vandre lengre på geléen. Man blottes deretter proteinene over på en membran ved hjelp av strøm og kan så detektere proteiner man er interessert i ved hjelp av antistoffer. I vårt forsøk gjorde vi dette på en indirekte måte hvor vi først brukte primære antistoff rettet mot virale og cellulære proteiner, deretter sekundære, infrarødt fluoriserende antistoff rettet mot de primære antistoffene. Vi tilsatte størrelsesmarkøren LICOR Chameleon Duo med kjente proteinstørrelser som hjelp til å bestemme proteinstørrelse.

3 dpi høstes cellene til western blot. Dette gjøres ved at supernatant fjernes, før cellene vaskes med PBS og deretter tilsettes 100 μ l lysesbuffer med prosetasehemmere (Ripa). To og to brønner med like forhold slås sammen for å gi et gjennomsnittlig resultat. Lysatet overføres så til rør og fryses ved -70°C frem til analysering. Prøvene tines og prepares på is ved at de tilsettes Invitrogen NuPAGE LDS Sample Buffer (4x) og Reducing Agent (10x). Prøvene lastes så på 10 x 1mm NuPAGE 4-12% Bis-Tris proteingel. Volum per bane var 25 μ l for prøver og 5 μ l for størrelsesmarkører. Deretter utføres proteinelektroforese i NuPAGE MES Running Buffer på 200 V i 40 minutter. Etter proteinelektroforese utføres blotting over på membran i blottingbuffer på 30 V i 60 minutter.

Membranen blokkes med Odyssey Blocking Buffer, fortynnet 1:2 i PBS, i 60 minutter ved romtemperatur. Deretter tilsettes primærantistoffer mot agnoprotein, VP1, GAPDH, to ulike antistoffer mot LTag (**Tabell 2**) og detergenten polysorbat 20 (Tween 20). Membranen inkuberes i primærantistoff på spinnehjul ved 4°C over natten. Dagen etter vaskes membranen 4 x 5 minutter med 3 ml trisbufret natriumklorid (TBS) med tween 20 (TBST). Sekundære, infrarødt merkede antistoffer brukt er anti-mus 680 og anti-kanin 800 (i konsentrasjoner på henholdsvis 1:20 000 og 1:15 000). Disse er fortynnet i TBST med 0,1% natriumdodecylsulfat (SDS). Membranen inkuberes i sekundærantistoff i 60 minutter ved romtemperatur på spinnehjul. Deretter vaskes membranen 4 x 5 minutter med 3ml TBST, før den til slutt vaskes én gang 5 minutter i TBS.

Membranen analyseres så i en infrarød skanner (LI-COR Odyssey CLx). Analyse av det skannede bildet ble så utført i LI-COR Image Studio 5.2.

Dette programmet analyserer signalintensitet fra hvert bånd og normaliserer dette ut i fra hvor stort område som er analysert og bakgrunnsignal, og uttrykker dette i tallet *signal*. Det høyeste signalet fra GAPDH-båndet ble så brukt til normalisering av de andre båndene ved at hvert GAPDH-signal ble dividert på dette høyeste signalet for å oppnå en normaliseringsfaktor. Deretter ble signalet fra hvert proteinbånd dividert på den behandlingsgruppens normaliseringsfaktor for å få et normalisert signal som kompenserte for svakt GAPDH-signal. På en slik måte kan man kvantisere mengden av hvert av proteinene per celle ved hjelp av styrken på signalene i den skannede western blot-membranen.

3.6 Bearbeiding av resultater

Alle resultatene ble lastet inn i Microsoft Office Excel, analysert og fremstilt grafisk. Standardavvik ble beregnet basert på gjennomsnittsverdiene fra hvert av de selvstendige eksperimentene.

Excel ble benyttet til å utføre ensidig t-test for to utvalg med ulik varians, for å vurdere om det var noen forskjell mellom behandlede og ubehandlede celler. Vi satte de gjennomsnittlige resultatene fra cellene med lik behandling fra alle forsøkene sammen i en gruppe, og testet om disse resultatene var ulike gjennomsnittene fra de ubehandlede gruppene. En p-verdi $< 0,05$ ble ansett som signifikant.

XLfit, en Excel-pluging fra IDBS ble brukt for å regne ut 90% og 50% effektiv ODBG-CDV-konsentrasjon (EC_{90} og EC_{50}), 90% og 50% inhibitorisk konsentrasjon (CC_{90} og CC_{50}), samt 95% konfidensintervall for resultatene. Vi brukte en fem-parameter logistisk modell (XLfit modell 210) for å gjøre kurvetilpasning til datapunktene og lage en dose-responskurve. Selektivitetsindex (SI_{50} og SI_{90}) er lik CC/EC . Nedre konfidensintervall ble beregnet som $(CC_{90} - 95\% \text{ KI}) / (EC_{90} + 95\% \text{ KI})$ og øvre grense som $(CC_{90} + 95\% \text{ KI}) / (EC_{90} - 95\% \text{ KI})$

Til beregning av den effektive konsentrasjonen benyttet vi den prosentmessige reduksjonen i ekstracellulært BKPyV-DNA fra qPCR-analysene. For å beregne inhibitorisk konsentrasjon ble det brukt både prosentmessig reduksjon i ATP-konsentrasjon 3 dpi sammenlignet med ubehandlede celler og prosentmessig reduksjon i celleindeks 3 dpi sammenlignet med ubehandlede celler.

4 Resultater

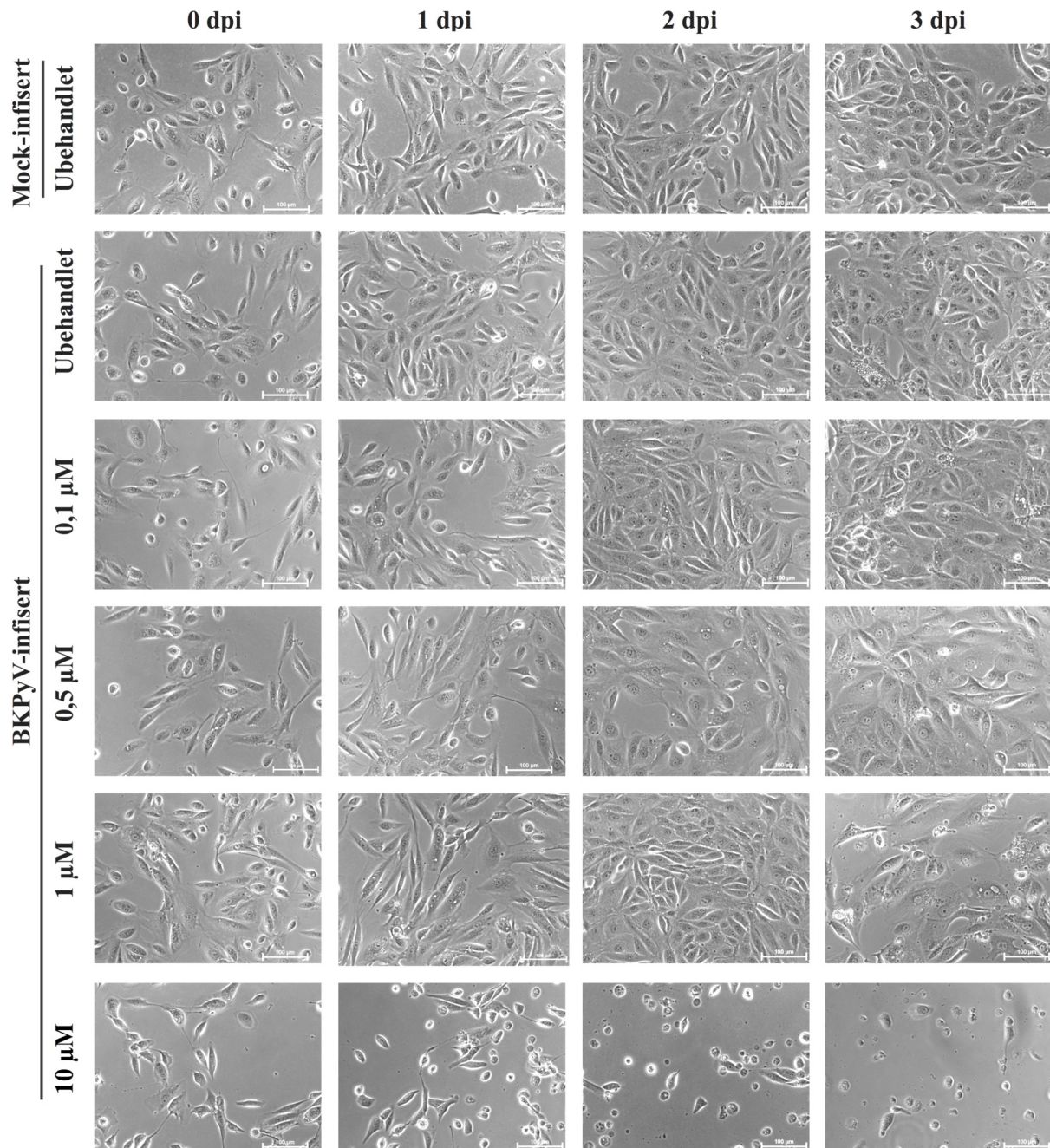
4.1 Effekt av ODBG-CDV-CDV på celleviabilitet

4.1.1 Påvirkning av cellemorfologi

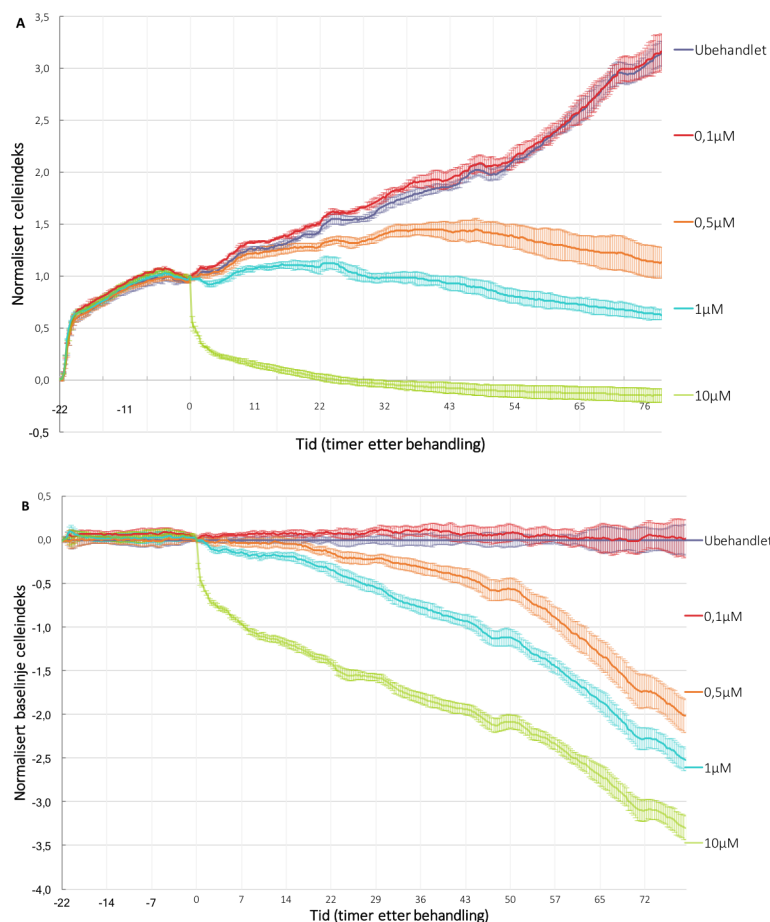
Etter fosforylering vil ODBG-CDV fungere som en asyklisk nukleotidanalogue, som sannsynligvis vil kunne inkorporeres i DNA og hemme human DNA-polymerase. For å kunne avgjøre om en eventuell reduksjon av virusreplikasjon skyldes cytotoxiske eller cytostatisk effekter, eller en direkte effekt på virusreplikasjon, er det viktig å først undersøke hvordan medikamentet påvirker celleviabiliteten.

For å undersøke om ODBG-CDV-behandling forårsaker morfologiske endringer av BKPyV-infisert RPTEC, ble cellene behandlet med 0 til 10 μM ODBG-CDV fra 2 timer post infeksjon (tpi) og det ble tatt bilder med fasekontrastmikroskop av cellene hver dag til og med 3 dpi (**Figur 1**). Ubehandlete celler ble tilsatt REGM med buffer i samme konsentrasjon som behandlede celler for å kunne kompensere for eventuelle effekter av bufferen alene. Ved behandling med 0 eller 0,1 μM ODBG-CDV viser cellene ingen synlige tegn på behandling på noen av tidspunktene. Ved ODBG-CDV-konsentrasjon på 0,5 μM ser cellene fortsatt fine ut, men det er færre og større celler, noe som tyder på en viss cytostatisk effekt. Ved ODBG-CDV-konsentrasjoner på 1,0 μM ses en enda tydeligere cytostatisk effekt, mens 10 μM ser ut til å ha en både cytostatisk og cytotoxiske effekt allerede fra én dag etter behandlingsstart. Sammenlignet med mock-infiserte celler viser BKPyV-infiserte celler noe flere vesikler i cytoplasma.

Vi konkluderer med at ODBG-CDV i konsentrasjon fra og med 0,5 μM har en cytostatisk effekt på RPTEC, mens ODBG-CDV-konsentrasjoner fra og med 10 μM i tillegg har en hurtig innsettende cytotoxiske effekt.



Figur 1: Effekt av økende ODBG-CDV-konsentrasjoner på cellemorfologi 0 – 3 dager etter infeksjon og behandling. Fasekontrastbilder tatt 0, 1, 2 og 3 dpi, forstørrelse 20X. Bildene er tatt omtrent samme sted i brønnen i løpet av samme forsøk for å fremstille et så likt område som mulig. µM angir konsentrasjon av ODBG-CDV som cellene er behandlet med. Ubehandlede celler har mottatt buffer i samme konsentrasjon som ODBG-CDV-behandlede celler. Konsentrasjoner på 0,5 µM ser ut til å ha hatt en viss cytostatisk effekt med noe færre og større celler, en effekt som er tydeligere ved 1,0 µM, mens 10 µM fører til massiv celledød allerede etter én dag.



Figur 2: ODBG-CDVs effekt på adhesjon og proliferasjon hos uinfisert RPTEC. To ulike fremstillinger av et representativt xCelligence-forsøk. Uinfiserte celler ble sådd ut, og behandlet med ODBG ett døgn etter utsåing. De ble deretter inkubert i 4 døgn, hvor data fra de 3 første døgnene vises i denne grafen. Forsøket ble gjentatt 6 ganger, med omtrent samme resultat. Hver graf representerer gjennomsnittet av målingene fra flere brønner med likt behandlede celler. Vi benyttet tre brønner til hver behandlingsgruppe, med unntak av 0,5 µM-gruppen hvor vi brukte fire brønner. I dette forsøket er én brønn fra 0,1 µM-parallellen fjernet på grunn av feilmelding om svært høyt bakgrunnssignal allerede fra bakgrunnsmåling og dermed et veldig avvikende signal.

A: Normalisert Celleindeks: På y-aksen vises Normalisert Celleindeks, som er definert som 1,0 og likt for alle behandlingsparallellelene like før behandling.

B: Baselinje Normalisert Celleindeks: På y-aksen vises Baselinje Normalisert Celleindeks, hvor ubehandlede celler har y-verdi definert som 0 gjennom hele forsøket, og de andre gruppenes utvikling vises relativt til denne gruppen. Normaliseringstidspunktet er like før behandling ett døgn etter utsæd, når alle parallellelene får y-verdi definert som 0.

4.1.2 Bestemmelse av celleindeks

For å kunne gjøre kontinuerlig vurdering av hvordan uinfiserte celler responderte på ODBG-CDV ble det utført impedansmåling ved hjelp av xCelligence.

Målinger av impedans ble startet 30 minutter etter at cellene var sådd ut i E-plater og celleindeks normaliseres i det ODBG-CDV-behandling starter dagen etter. Resultatene viser en økning i celleindex for alle brønner frem til behandling startet cirka 22 timer senere, noe som betyr at cellene fester seg, strekker seg ut og er i deling (**Figur 2A**).

Celler som kun hadde mottatt buffer og celler som hadde mottatt 0,1 µM ODBG-CDV viser den samme jevne stigningen i celleindeks gjennom hele forsøket (**Figur 2A**). Vi så også i noen forsøk at celler behandlet med 0,1 µM ODBG-CDV kunne ha en celleindeks som oversteg ubehandlede celler (data ikke vist). Celler behandlet med 0,5 µM ODBG-CDV, viser kun en forbigående liten økning i celleindeks før den går ned til samme nivå som før behandling. Celler

behandlet med 1,0 μM ODBG-CDV viser en svak økning i celleindeks det første døgnet etter behandling men deretter faller det raskt. For celler behandlet med 10 μM ODBG-CDV, faller celleindeks til 0 i løpet av få timer.

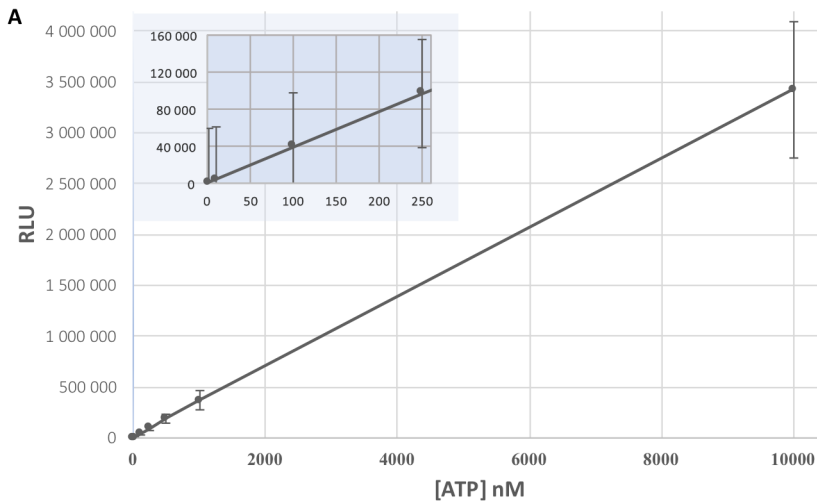
Resultatene kan også normaliseres ved å sette celleindeks for ubehandlede celler som null (**Figur 2B**). Resultatene viser samme trend men tydeliggjør at 0,1 μM ikke har noen negativ effekt på celleindeks i løpet av observasjonsperioden og at det tar cirka 14 timer før behandling med 0,5 og 1,0 μM gir en negativ effekt på celleindeks. Ved målinger utover 3 døgn etter behandlingsstart viser også ubehandlede celler og celler behandlet med 0,1 μM avflatende kurver (data ikke vist), sannsynligvis på grunn av lite næring i vekstmedium, uttørring eller vekst til konfluens.

Ved noen forsøk ble det skiftet cellemedium for å se om behandling hadde en vedvarende effekt. Det ble skiftet medium hver 24. time eller først 72 timer etter behandling. Skiftning av medium ga en forbigående plutselig økning i celleindeks, men celleindeks gikk så tilbake til å følge sin opprinnelige kurve (data ikke vist), altså fremdeles stigende for ubehandlede celler og celler behandlet med 0,1 μM , mens synkende for resterende grupper. Dette kan tyde på at toksiske og cytostatiske effekter av ODBG-CDV er irreversible når de først setter inn.

Vi konkluderer med at ODBG-CDV i konsentrasjoner på 0,5 μM og høyere gir en irreversibel cytostatisk effekt på RPTECs. Mens en kortvarig behandling med 0,1 μM ikke ser ut til å skade cellene med tanke på proliferasjonen, overlevelse og adhesjon til underlaget, har 10 μM en klar cytotoxisk effekt.

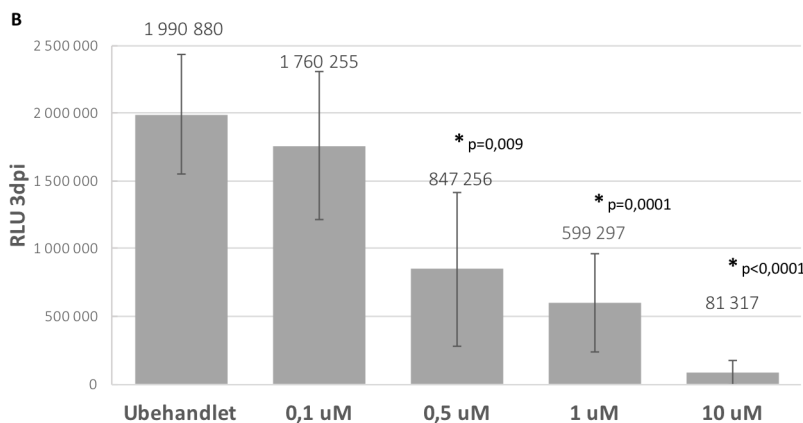
4.1.3 Påvirkning av metabolisme

Cellenes metabolisme som uttrykk for deres viabilitet ble undersøkt ved å undersøke konsentrasjonen av ATP i lysat av uinfiserte celler behandlet med ODBG-CDV. ATP-målinger blir uttrykt som relative luminiscent units (RLU). Først undersøkte vi forholdet mellom RLU og ATP-konsentrasjon, og fikk samtidig undersøkt metodens lineære område. Seriefortynninger av en ATP stockløsning ble utført og fortynninger tilsatt CellTiterGlo-reagens. Resultatene viser at 250 nM ATP tilsvarer omtrent 100 000 RLU (**Figur 3A**). Dessuten ser vi at metoden har et bredt lineært område og er lineær opp til minst 10 000 nM ATP (**Figur 3A**). Ved ATP-konsentrasjoner opp til 25 000 nM observerte vi en svak avflatning (data ikke vist), men dette påvirket ikke våre forsøk da ingen av forsøkene våre viste så høye RLU-verdier.



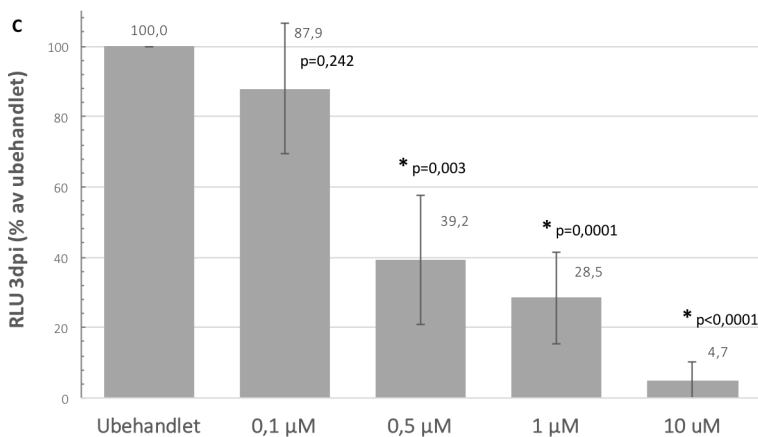
Figur 3: Innvirkningen av ODBG-CDV på celledmetabolisme.

A: Forholdet mellom RLU og ATP. Grafen representerer gjennomsnitt fra 3 forsøk, hvor hvert forsøk hadde tre parallelle brønner per ATP-konsentrasjon. Standardavvik er beregnet mellom gjennomsnitts-verdiene fra forsøkene. Grafen viser at forholdet mellom [ATP] og RLU er lineært i et område minst opp til 10 000 nM.



B: Viabilitet av RPTECs 3 dager etter ODBG-CDV-behandling.

Figuren viser hvordan RLU, som et uttrykk for konsentrasjonen av ATP endres ved tre dagers behandling med ODBG-CDV i ulike konsentrasjoner. Resultatene som er vist her er fra 5 selvstendige forsøk, og standardavvikene er beregnet mellom gjennomsnittsverdiene fra disse forsøkene.



C: Viabilitet av RPTECs 3 dager etter ODBG-CDV-behandling, sammenlignet prosentvis med ubehandlet RPTEC.

Data her er samme som presentert i 3C, men her er den prosentmessige reduksjonen av RLU etter 3 dagers ODBG-CDV-behandling sammenlignet med RLU-verdiene til celler som kun hadde fått buffer i samme konsentrasjon. Som over representerer diagrammet gjennomsnittet fra 5 selvstendige forsøk og standardavvik er beregnet mellom gjennomsnittsverdiene fra disse forsøkene.

For å undersøke ATP i behandlede og ubehandlede celler ble cellene sådd ut, og dagen etter utsåing behandlet med 0 til 10 μ M ODBG-CDV. Tre dager etter behandling ble cellene tilsatt CellTiter Glo reagens og luminiscens-signalet målt og uttrykt som RLU (**Figur 3B**) og som prosentvis reduksjon i RLU i forhold til RLU fra ubehandlede celler (**Figur 3C**). Resultatene viser cirka 12% reduksjon i ATP-konsentrasjon i

* markerer signifikant endring sammenlignet med den ubehandlede gruppen.

RPTEC som har mottatt 0,1 μM ODBG-CDV i omtrent 72 timer (**Figur 3C**). Ved behandling med 0,5 μM ODBG-CDV reduseres ATP med hele 60%, mens ATP reduseres med henholdsvis 70 og 95% i celler behandlet med 1,0 og 10 μM . Reduksjonen i RLU fra ubehandlede celler var signifikant ved ODBG-CDV-konsentrasjoner over 0,5 μM , bedømt med t-test (**Figur 3C**).

Vi konkluderer med at 0,1 μM ODBG-CDV i våre forsøk ga en liten, men ikke signifikant reduksjon i cellenes totale metabolisme, noe som samsvarer med at vi ikke kunne observere endringer verken ved mikroskopi eller xCelligence-målinger. Høyere ODBG-CDV-konsentrasjoner fører til mer enn en halvering av cellenes metabolisme, mens 10 μM nærmest totalt hemmer metabolismen.

4.2 Effekt av ODBG-CDV på BKPyV-replikasjon

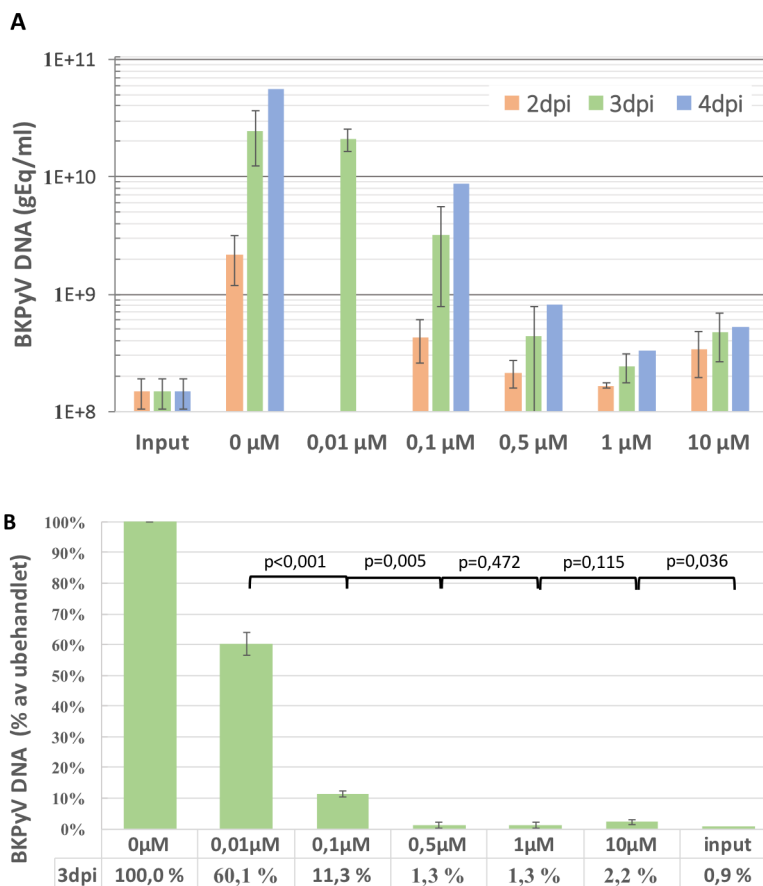
4.2.1 ODBG-CDVs påvirkning på frigjøring av nydannet BKPyV

BKPyV bruker mellom 2 og 3 dager på å fullføre en replikasjonsyklus i RPTEC (13). For å undersøke ODBG-CDVs effekt på virusreplikasjonen, ble cellene først infisert med BKPyV i 2 timer, før behandling med 0,01 – 10 μM ODBG-CDV ble startet. Det ble høstet et lite volum supernatant 4 timer etter infeksjon fra ubehandlede celler for å måle input-DNA (fra nå kalt input), men ellers ble supernatant høstet 2, 3 eller 4 dpi og analysert med BKPyV-qPCR.

Resultatene viser at mengden BKPyV-DNA i supernatant fra ubehandlede celler (0 μM) øker med økende tid etter infeksjon og at ODBG-CDV reduserer den ekstracellulære mengden BKPyV-DNA, uttrykt som genomekvivalenter per milliliter (gEq/ml), i et doseavhengig forhold (**Figur 4A**).

I mer detalj ser vi at hos ubehandlede celler øker BKPyV DNA mer enn 1 log fra inputnivået 0 dpi til 2 dpi, deretter ytterligere 1 log fra 2 dpi til 3 dpi før kun en svak økning til 4 dpi (**Figur 4A**). Resultatene forteller oss at vi har oppnådd en vellykket infeksjon med rikelig med infiserte celler og høy virusreplikasjon. Det forteller oss også at BKPyVs replikasjonsyklus i noen celler tar under 48 timer da det innen 48-timerstidspunktet allerede var dannet mye virus, mens noen celler ser ut til å kreve mellom 48 og 72 timer. BKPyV-mengden i supernatant høstet 4 dpi kan også være delvis resultat av sekundærinfeksjon fra nydannet virus.

Resultatene kan også presenteres som prosent BKPyV-DNA i forhold til supernatant fra ubehandlede celler (**Figur 4B**). Resultatene viser at mengden ekstracellulært BKPyV-DNA 3 dpi blir redusert med nesten 90% (til 11,3% (SD \pm 3,78%)) ved behandling med 0,1 μM ODBG-



Figur 4: Ekstracellulær BKPyV-DNA-mengde 3 dpi etter ODBG-CDV behandling. A: Supernatanter er høstet 2, 3 og 4 dpi fra BKPyV-infiserte celler som har vært behandlet med ulike konsentrasjoner ODBG-CDV. DNA-mengde (gEq/ml) måles med BKPyV-qPCR. Stolpene representerer gjennomsnittet fra 4 forsøk for 3 dpi, 2 forsøk for 2 dpi og ett forsøk for 4 dpi-tidspunktet, og viser BKPyV DNA load som genomekvivalenter (gEq)/ml. Standardavvik mellom forsøkene er vist. Inputnivå representerer den mengden virus-DNA som var i prøven allerede ved infeksjon, og det må skje en økning fra dette at man skal kunne si det har skjedd en replikasjon. Som vi ser har det blitt produsert en betydelig mengde virus allerede ved 2 dpi etter infeksjon. Det er likevel en ytterligere økning til 3 dpi, noe som kanskje kan bety at størsteparten av de infiserte cellene bruker mellom 2 og 3 dpi på å fullføre en virusreplikasjonsyklus.

B: Ekstracellulær BKPyV-DNA-mengde ODBG-behandlet RPTEC prosentvis i forhold til ubehandlet RPTEC. Viser uttrekk av samme data som i 4A men her er den prosentmessige mengden ekstracellulært BKPyV-genom 3 dpi sammenlignet med den mengden som var til stede samme tidspunkt i ubehandlede celler.

Klammer markerer p-verdien til forskjellen mellom to grupper bedømt med t-test.

CDV, og med ~99% ved behandling med 0,5 µM til 1,3% (SD±0,8%). Behandling med 1,0 og 10 µM førte til omtrent samme nedgang som når 0,5 µM ble benyttet med henholdsvis 1,3% (SD±0,9%) og 2,2% (SD±1%) av mengden ekstracellulært BKPyV-genom i ubehandlede paralleller. Forskjellen i BKPyV-mengde i supernatant fra celler behandlet med 0,01 µM sammenlignet med ubehandlede celler var signifikant (p=0,006). Resterende

behandlingsgrupper inneholdt også signifikant mindre BKPyV-DNA enn ubehandlede celler ($p < 0,0001$).

Det var ingen signifikant forskjell i ekstracellulær BKPyV-DNA-mengde 3 dpi ved behandling med 0,5 og 1,0 μM ODBG-CDV og heller ingen forskjell mellom 1,0 og 10 μM (**Figur 4B**).

Input inneholdt gjennomsnittlig 0,9% BKPyV-DNA av den mengden supernatanten til ubehandlede celler inneholdt. Celler behandlet med 10 μM ODBG-CDV inneholdt 2,2% BKPyV-DNA av ubehandlet, noe som er marginalt mer enn input, men signifikant ($p = 0,036$). Celler behandlet med 1,0 μM ODBG-CDV inneholdt også signifikant mer (1,3% mot 0,9% ($p = 0,005$)) BKPyV-DNA enn input (**Figur 4B**), mens 0,5 μM ODBG-CDV som også ga reduksjon til 1,3% ikke viste signifikant høyere BKPyV-DNA-mengde enn input.

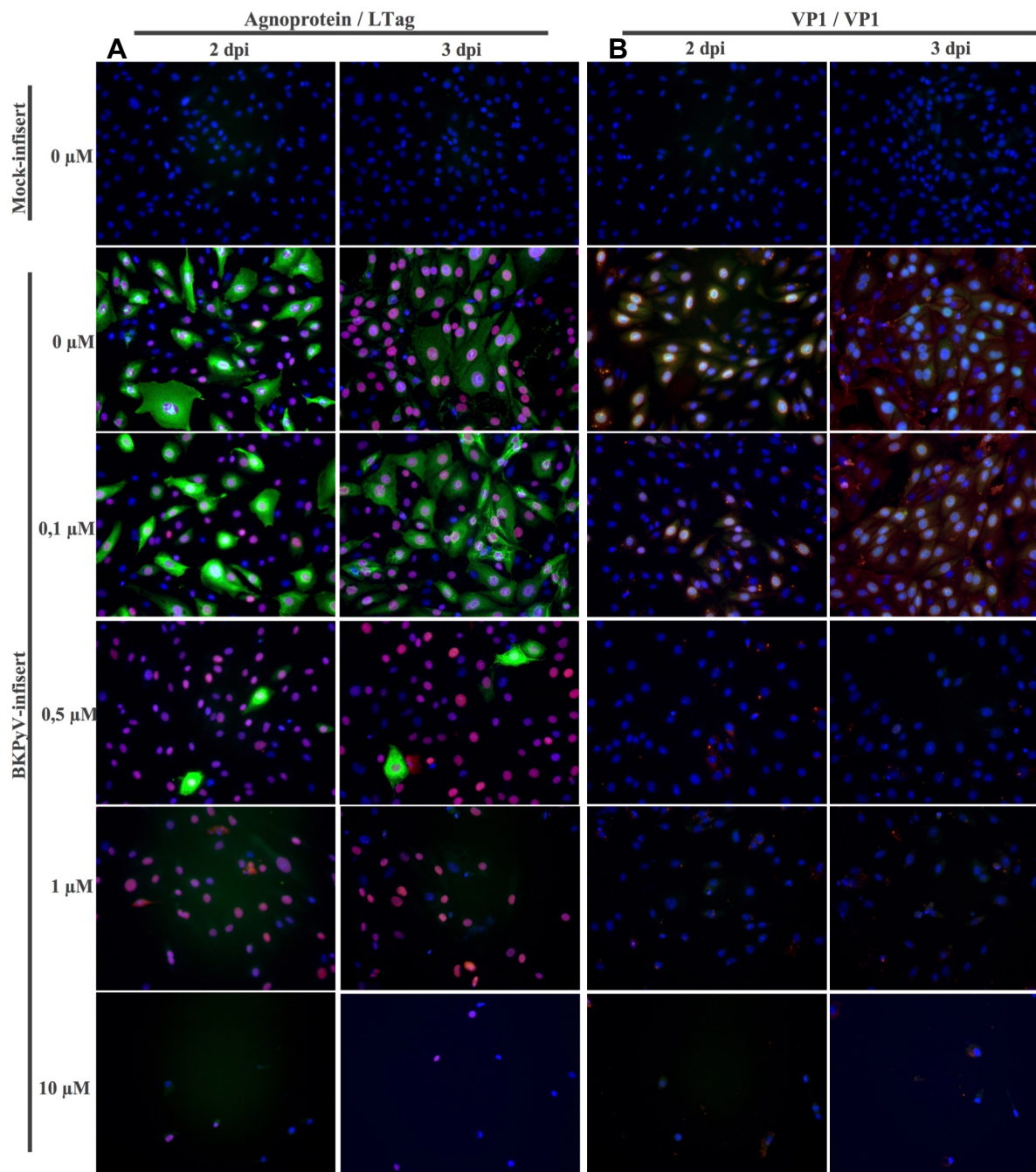
Ved de fleste forsøkene har det vært en tendens til at BKPyV-DNA-mengde har vært noe høyere ved behandling med 10 μM enn 1,0 μM , noe vi ikke vet årsaken til.

Vi konkluderer med at ODBG-CDV på et effektivt vis reduserte produksjonen av nye ekstracellulære virus. Det er et klar dose-respons-forhold, men med konsentrasjoner fra og med 0,5 μM er reduksjonen nesten til input-nivå, noe som vil si at det i praksis nesten ikke er blitt produsert virus.

4.2.2 Påvirkning på viralt proteinuttrykk

For å vurdere hvordan ODBG-CDV i ulike konsentrasjoner påvirket viralt BKPyV-proteinuttrykk i RPTEC ble celler fiksert 2 og 3 dpi, og immunfluorescensfarging med farging mot BKPyVs tidlige og sene proteiner utført.

Immunfluorescensmikroskopi av ubehandlede celler fiksert 3 dpi viser det tidlige proteinet LTag i kjernen av majoriteten av cellene (**Figur 5A**, rødt), mens det sene proteinet agnoprotein uttrykkes i cytoplasma på mange celler (**Figur 5A**, grønt). For farging av VP1 ble det brukt et monoklonalt og et polyklonalt VP1-antistoff sammen. VP1 finnes i kjernen på mange celler (**Figur 5B**, rødt og grønt), men spesielt med det monoklonale antistoffet ser vi også mye VP1 i cytoplasma (**Figur 5B**, rødt).

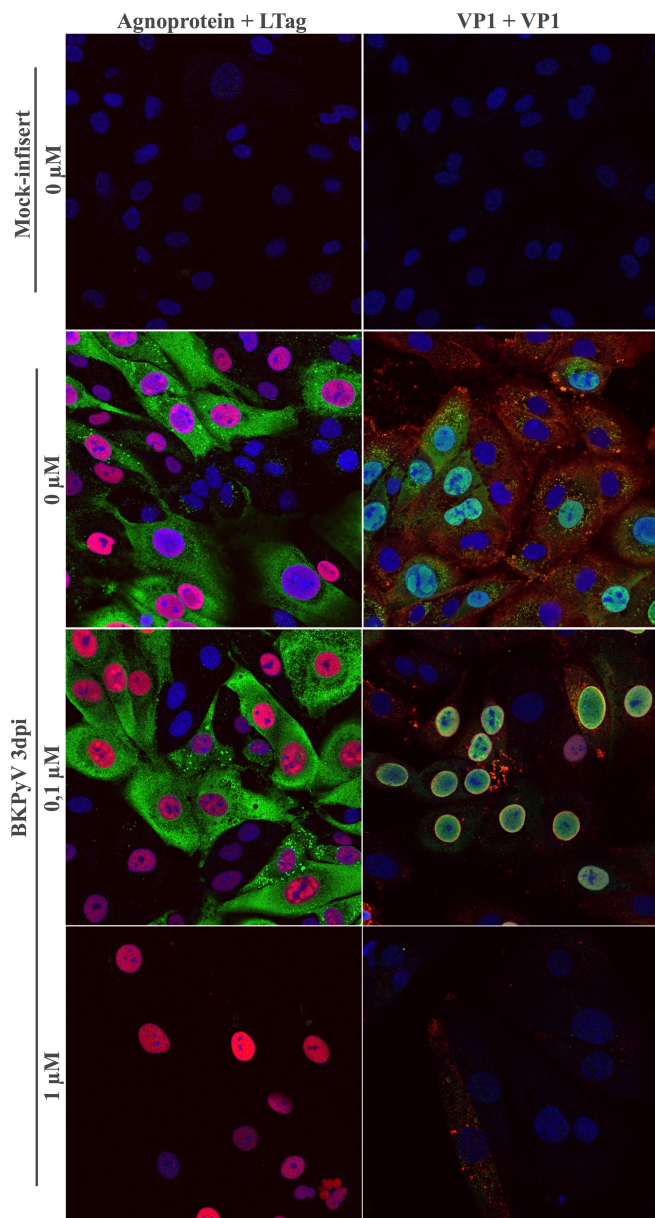


Figur 5: Effekt av ODBG-CDV på tidlig og sent BKPyV-proteinuttrykk i RPTEC, bedømt med immunfluorescensmikroskopi. Immunfluorescensmikroskopi av mock-infiserte og BKPyV-infiserte RPTEC 2 og 3 dager etter infeksjon, behandlet med ulike ODBG-CDV-konsentrasjoner.

A: Cellene farget for agnoprotein (grønt), LTag (rødt) og med draQ5 (blått) mot humant DNA.

B: Cellene er farget med et monoklonalt antistoff mot VP1 (rødt) og et polyklonalt antistoff mot VP1 (grønt). Mer informasjon om primærantistoffer i **tabell 2**.

Vi har oppnådd en vellykket infeksjon med rikelig med infiserte celler og mye viralt proteinuttrykk allerede ved 2 dpi. Uttrykket av virale proteiner øker fra 2 til 3 dager. ODBG-CDV i doser fra 0,5 μM reduserer uttrykket av sene BKPyV-proteiner betydelig. LTag er uttrykt også i celler behandlet med 1,0 μM og i enkelte celler behandlet med 10 μM .



Figur 6: ODBG-CDVs effekt på BKPyV-proteinuttrykk, bedømt med konfokalmikroskopi: Bilder tatt med konfokalmikroskop 40X forstørrelse av mock-infiserte og BKPyV-infiserte celler 3 dpi, farget i på to ulike måter; med agnoprotein (grønn) og Ltag (rød), samt VP1 poly (grønn) og VP1 mono (rød). Konsentrasjoner angir hvilken konsentrasjon ODBG-CDV cellene ble behandlet med.

Det er en betydelig reduksjon i VP1-uttrykk mellom ubehandlede celler og celler behandlet med 0,1 μM . Likevel ses mange celler med stort nukleært uttrykk av VP1 ved 0,1 μM . Vi ser heller ingen åpenbar reduksjon i agnoprotein-uttrykk fra ubehandlede celler til 0,1 μM .

Forskjellen mellom 0,1 μM og 1,0 μM er stor når det kommer til uttrykk av sene proteiner. Det ses ikke noe uttrykk av agnoprotein, og kun cytoplasmatiske vesikler med VP1. Som tidligere ser LTag-uttrykket til å være resistent mot ODBG-CDV-konsentrasjoner på 1 μM .

Antall celler med uttrykk av sene virale proteiner minker ved økende konsentrasjoner av ODBG-CDV (Figur 5A og B). De sene proteinene uttrykkes etter viral DNA-replikasjon. Antall celler som uttrykker LTag reduseres også med økende ODBG-CDV-konsentrasjon, men på langt nær så mye som de sene virale proteinene. Til og med ved 10 μM ses det noen få celler som uttrykker LTag. Tilstedeværelse av LTag viser at en celle er infisert med BKPyV og at den har vært infisert i minst 12-24 timer (13), men betyr ikke nødvendigvis at det finnes virusreplikasjon.

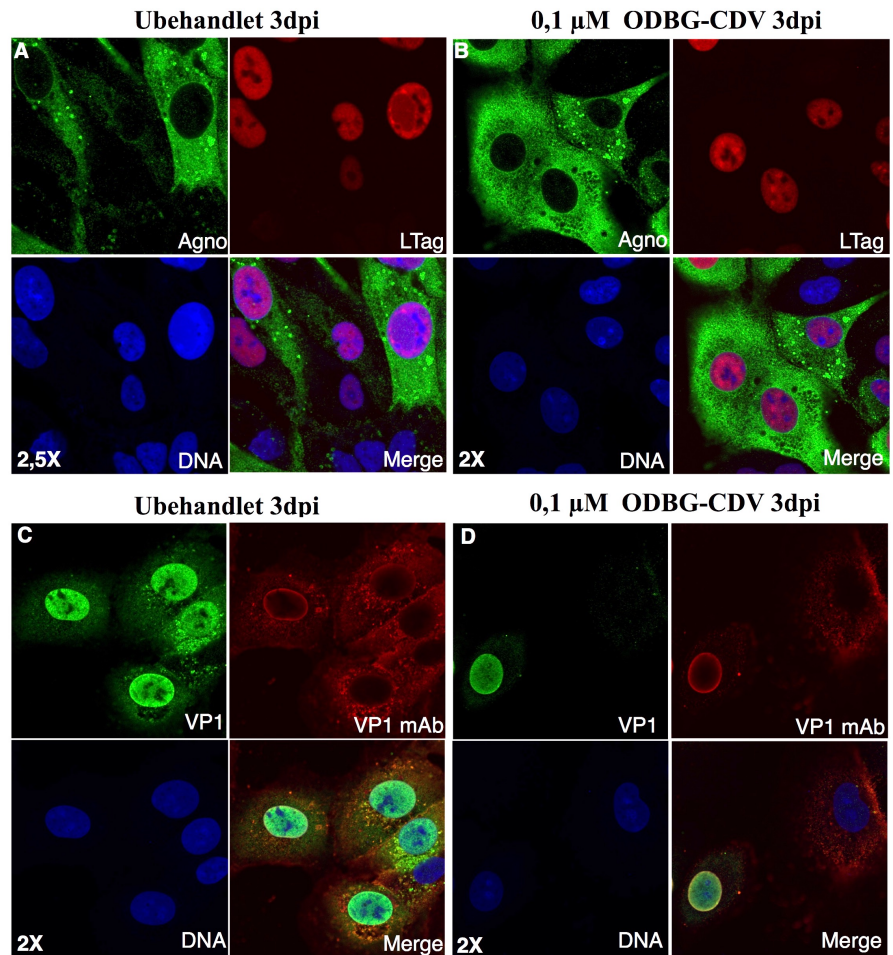
3 dpi er det vanskelig se en forskjell i viralt proteinuttrykk mellom celler behandlet med 0,1 μM og ubehandlede celler. Ved 0,5 μM ses en klar reduksjon, spesielt i celler som uttrykker sene proteiner. En interessant observasjon er at når enkelte av de behandlede cellene likevel

uttrykker agnoproteiner, uttrykker de dette i minst like stor grad som ubehandlede celler. Dette er annerledes for VP1. Fra og med 0,1 μM ODBG-CDV er det ingen celler som har kraftig VP1-uttrykk i kjernen, og VP1-uttrykk er dessuten mye svakere. Vi ser at ved de høyeste konsentrasjonene, 1,0 og 10 μM , er det svært lite celler (Figur 5, blått), noe som i seg selv kan forklare den lave produksjonen av virale proteiner.

Allerede 2 dpi er det i mange celler uttrykt sene proteiner i ubehandlede

celler og celler behandlet med 0,1 μM ODBG-CDV, men antallet infiserte celler er mindre enn ved 3 dpi, og det er også færre celler som uttrykker sene proteiner (Figur 5). Det som dog er mest påfallende er at det for ubehandlede celler er mye mindre VP1-farging i cytoplasma ved 3 dpi når det monoklonale VP1-antistoffet benyttes.

For å oppnå høyere forstørrelse og bedre oppløsning, ble det også gjort konfokalmikroskopi 3 dpi med celler farget med de samme antistoffene som tidligere (Figur 6 og 7). Resultatene er i hovedsak som tidligere men på grunn av større oppløsning ser vi mer detaljer i farging enn ved bruk av lysmikroskop. I VP1-fargede ubehandlede celler ser vi tydelige virusinkludsjoner i noen av kjernene (Figur 6). Ved 1,0 μM ser vi også hvordan en tilsynelatende uinfisert celle (uten VP1 i kjernen) har VP1 oppkonsentrert i vesikler i cytoplasma. Ved denne ODBG-CDV-



Figur 7: ODBG-CDVs effekt på tidlige og sene BKPvV-proteiner, tatt med konfokalmikroskop og zoomet. RPTEC ble sådd ut og infisert med BKPvV som tidligere beskrevet. Bildene er tatt 3 dpi med 40X objektiv og enten 2,5X eller 2X zoom. 7A og 7B viser celler farget for agnoprotein (grønt) og LTag (rødt). 7B og 7C viser celler farget med polyklont (grønt) og monoklont (mAb) (rødt) antistoff mot VP1. DNA-farging (blå) markerer levende celler. Merk at 7A er tatt med 2,5X zoom.

konsentrasjonen lages det i følge våre qPCR-data knapt nye virus, men dette ser ut som en nyinfisert celle (**Figur 6**)

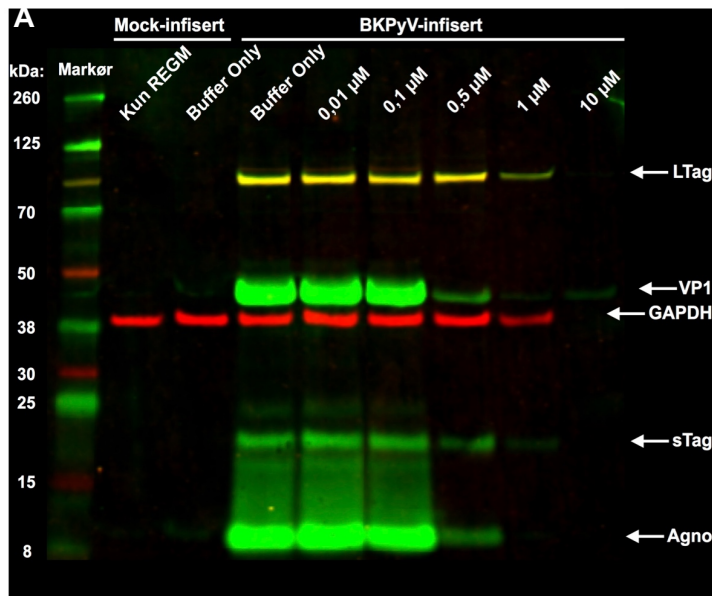
Ved behandling med 0,1 μM ser vi nå en stor reduksjon i VP1 i cytoplasma, mens agnoproteinuttrykk er lite berørt (**Figur 7**). VP1-fargingen etter behandling er faktisk svært lik det vi ser 2 dpi i ubehandlet RPTeC. Vi tror derfor at VP1-fargin i kjernen først og fremst er nydannende viruspartikler, mens VP1-farging i cytoplasma er viruspartikler som nettopp er tatt opp av cellen og fraktes gjennom cytoplasma i vesikler. Hvis dette er tilfellet foregår det lite sekundærinfeksjon 3 dpi ved behandling med 0,1 μM ODBG-CDV.

For å bedre kunne kvantitere effekt av ODBG-CDV på viralt proteinuttrykk ble det også høstet cellelysat 3 dpi og western blott med primærantistoff mot LTag/sTag, VP1, agnoprotein og glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) utført. Vi brukte housekeepingproteinet GAPDH som markør på mengde celler for å kunne normalisere signalet av de ulike proteinene. Resultatene fra western blott-analyse vise at ubehandlede BKPyV-infiserte celler uttrykker LTag, sTag, VP1, agnoprotein og GAPDH (**Figur 8A**). Ved behandling med 0,5 μM ODBG-CDV, reduseres uttrykket av spesielt VP1, sTag og agnoprotein betydelig og mens behandling med 0,1 μM ODBG nærmest totalt hindrer uttrykk av VP1 og agnoprotein. Ved behandling med 10 μM ses kun et svakt VP1-bånd. Et tilnærmet fraværende uttrykk av GAPDH, tilsier at lysatet inneholdt en svært liten mengde celler.

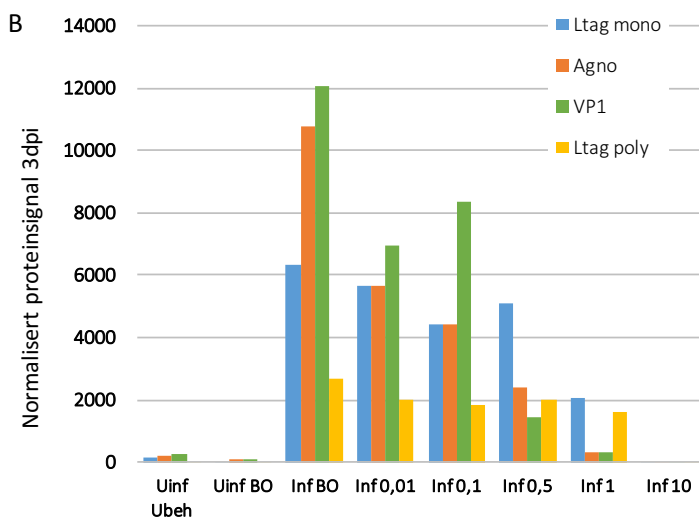
Resultatene fra western blott underbygget det vi allerede hadde observert med ODBG-CDVs effekt på BKPyV-proteinuttrykk. ODBG-CDV i økende konsentrasjoner fører til redusert konsentrasjon av sene proteiner allerede fra 0,1 μM . LTag er det proteinet som viser størst motstandsdyktighet mot ODBG-CDV.

VP1-signalet vises omtrent like svakt ved 1 og 10 μM , noe vi tolker til å være input-signal, altså ikke nydannede virusproteiner, men proteiner som var til stede i cellene fra infeksjon. Båndet over agnoprotein tolkes til å være sTag siden dette proteinet deler N-terminal med LTag og siden et av de antistoffene som fremstår som grønne er et polyklonalt LTag-antistoff rettet mot N-termale del. Det er kjent at agnoprotein kan danne dimere og oligomere (15), og det er sannsynlig dette halen som strekker seg oppover fra agnoprotein-båndet representerer. Det røde LTagbåndet kommer av binding til det monoklonale LTag-antistoffet, rettet mot proteinets C-terminale del.

For å kunne normalisere for antall celler i lysatet, ble signalene i membranen kvantitert og signal for virale proteiner normalisert mot signal for GAPDH. Resultatene viser ut ubehandlede

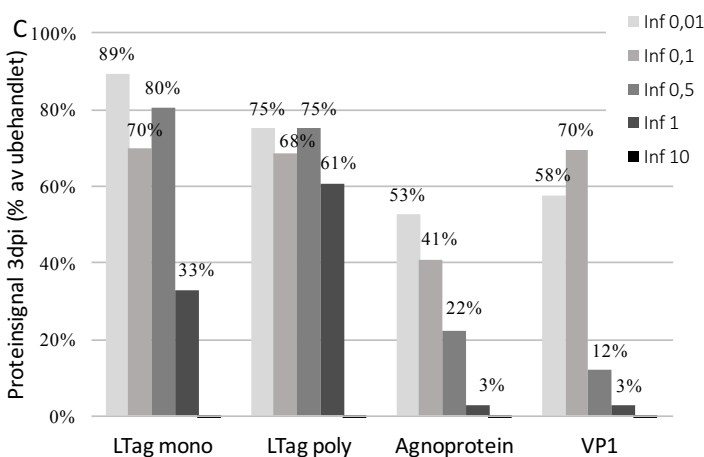


Figur 8: Kvantifisering av ODBG-CDVs effekt på viralt proteinuttrykk bedømt med western blott. Celler ble infisert med BKPvY og behandlet med ODBG-CDV i ulike konsentrasjoner i 3 dager. Våre negative kontroller ble mock-infisert og ble deretter enten kun behandlet med vekstmedium (REGM) eller med buffer i samme konsentrasjon som de ODBG-CDV-behandlede cellene (buffer only). Figuren viser et representativt forsøk av totalt 4 gjennomførte western blott.



A: Scannet western blot-membran, farget med antistoffet mot Agnoprotein (7,4kDa) (grønt), VP1 (40,1kDa) (grønt) og LTag (80,5kDa); polyklonalt (grønt) og monoklonalt (rødt), samt GAPDH (37kDa) (rødt) (6). Proteinuttrykket ser ut til å være likt både for GAPDH ved 0, 0,01 og 0,1 μ M. Deretter følger et drastisk fall i både GAPDH-signal og signal fra virale proteiner ved økende ODBG-CDV-konsentrasjoner.

B: Absolutte signalverdier for virale proteiner i ulike behandlingsgrupper, data hentet ut fra Figur 8A. Signalene er normaliserte mot det sterkeste GAPDH-signalet, som var i 0,01 μ M-behandlingsgruppen. Negative signaler er utelatt.



C: Prosentvise signaler sammenlignet med signalet fra infiserte, ubehandlede celler, som er satt til 100%. Negative signaler er utelatt. Data hentet ut fra Figur 8A.

celler har høyest uttrykk av VP1 og agnoprotein og omtrent halvparten så sterkt uttrykk av LTag og et lavt uttrykk av sTag (**Figur 8B**). Ved behandling med 0,01 μ M ODBG-CDV halveres uttrykket av VP1 og agnoprotein mens uttrykk av LTag og sTag er uforandret. Ved

behandling med 0,1 μM påvirkes tilsynelatende agnoprotein mer enn VP1. Proteinene sTag er tilsynelatende upåvirket med ODBG-CDV konsentrasjoner til og med 1,0 μM .

De normaliserte resultatene kan også presenteres som prosent av proteinuttrykket til ubehandlede celler (**Figur 8C**). Resultatene for LTag vises for hver av antistoffene som er benyttet mens resultatene for sTag er utelatt. Her vises tydelig dose respons-effekten som vi tidligere har sett ved immunfluorescensmikroskopi, hvor de sene proteinene agnoprotein og VP1 reduseres mye allerede ved lave ODBG-CDV-konsentrasjoner. Agnoprotein-signalet ble redusert med 47%, 59%, 78% og 97% ved henholdsvis 0,01, 0,1, 0,5 og 1 μM . Uttrykk av det tidligere proteinet LTag ser ut til å være mye mindre påvirket av ODBG-CDV, og er fortsatt knapt 40% redusert ved ODBG-CDV-konsentrasjon 1,0 μM . Bortsett fra signalet fra det monoklonale LTag-antistoffet ved behandling med 1,0 μM ODBG-CDV, ser det ikke ut til å være store forskjeller mellom signalet som oppnås fra det polyklonale og det monoklonale LTag-antistoffet.

Fra undersøkelsene på BKPyV-protein i RPTEC konkluderer vi med at ubehandlede celler uttrykker både tidlige og sene proteiner fra 2 dpi, men at noen celler først uttrykker disse proteinene 3 dpi. Western blot viser at reduksjonen i sene virusprotein ved behandling fra og med 0,1 μM ODBG-CDV, og reduksjonen er størst for agnoprotein. Uttrykk av det tidlige proteinet LTag er mindre påvirket. Ved bruk av konfokalmikroskop ser det ut som behandlede celler har mindre VP1 i cytoplasma, noe som kan bety at de har mindre sekundærinfeksjon enn ubehandlede celler.

4.3 Beregning av EC_{90} og CC_{90}

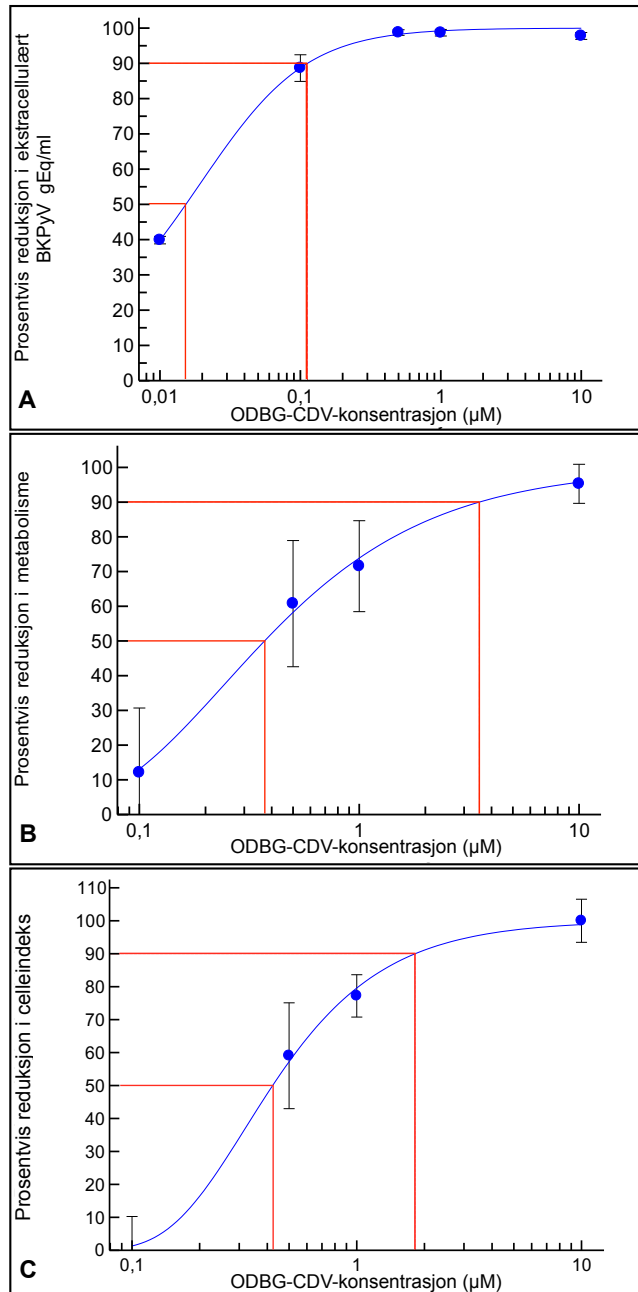
For å finne ODBG-CDV-konsentrasjonen som ga 90 og 50% hemming av henholdsvis virusreplikasjon, celledetabolisme og -viabilitet, brukte vi resultatene fra qPCR, ATP-målinger og xCelligence 3 dpi. EC_{90} ble beregnet til 0,112 μM (95% KI 0,046-0,179) (**Figur 9** og **Tabell 3**). For beregningene av inhibitorisk konsentrasjon er konfidensintervallene mye bredere, noe som både skyldes høyre standardavvik i datamaterialet og færre datapunkter siden vi ikke undersøkte viabilitetspåvirkningen ved 0,01 μM ODBG-CDV.

Figur 9: Dose-responskruver for ODBG-CDV i RPTEC 3 dpi.

A: Kurven for EC er basert på 5 ulike forsøk med BKPyV-qPCR på BKPyV-infisert RPTEC 3 dpi og ODBG-CDV-behandling i ulike konsentrasjoner. Prosentmessig reduksjon sammenlignet med ubehandlede celler er vist. Standardavvik er beregnet mellom gjennomsnitt fra 5 ulike forsøk.

B: Kurven er basert på 4 ulike forsøk med ATP-målinger i uinfisert RPTEC og ODBG-CDV-behandling i økende konsentrasjoner. Standardavvik er beregnet mellom gjennomsnittende fra de 4 ulike forsøkene.

C: Kurven er basert på resultater fra xCelligence-analysen presentert i figur 2. Standardavvik representerer standardavviket i dette forsøket.



Analysemetode	EC ₉₀ (95% KI)	EC ₅₀ (95% KI)		
qPCR	0,112 µM (0,046–0,179)	0,015 µM (0,004–0,026)		
	CC ₉₀ (95% KI)	CC ₅₀ (95% KI)	SI ₉₀ (95% KI)	SI ₅₀ (95% KI)
ATP-måling	3,515 µM (-17,16–24,19)	0,371 µM (-0,306–1,048)	31,3 (-96,1–525,6)	24,25 (-0,28–234,5)
Celleindeks	1,820 µM (-6,515–10,156)	0,422 µM (-0,257–1,102)	16,21 (-36,48–220,7)	27,6 (-9,8–246,6)

Tabell 3: Beregning av 50 og 90% cytotoxisk og effektiv konsentrasjon, 3 dpi. Beregninger av 50 og 90% effektive og inhibitoriske konsentrasjoner, samt selektivitetsindeks.

5 Diskusjon

Det er i dag ikke tilgjengelig noen spesifikk antiviral behandling mot polyomavirusykdommer som polyomavirusassosiert nefropati og hemorragisk cystitt. I denne oppgaven har jeg undersøkt *in vitro*-effekten av nukleosidanalogen ODBG-CDV på uinfiserte og på BKPyV-infiserte primære nyreepitelceller. Dette er så vidt vi har kjennskap til den første studien av effekten av ODBG-CDV på BKPyV-replikasjon og RPTEC-viabilitet, men flere lignende medikamenter er prøvd ut på BKPyV og RPTEC (5, 39).

Resultatene våre viser at det er et klart dose-responsforhold mellom konsentrasjonen av ODBG-CDV og inhibisjon virusreplikasjon, hvor økte konsentrasjoner av ODBG-CDV gir økt hemming av produksjon av viralt protein og nye virus.

Det har tidligere blitt vist at en effektiv PyVAN-behandling burde redusere frigjøringen av nytt virus med 90% (34). EC_{90} i vårt testsystem ble kalkulert til å være 0,11 μM (95% KI: 0,05 – 0,18) ODBG-CDV. Vi ser på western blott at denne konsentrasjonen gir en stor reduksjon i uttrykk av sene proteiner. Videre viser resultatene fra disse forsøkene at dette en konsentrasjon som potensielt er lite celledskadelig. Ved 0,1 μM reduseres ATP-konsentrasjonene med omtrent 10%, og xCelligenceanalysen viser at binding til underlaget og proliferasjon fortsetter som for ubehandlede celler.

Til sammenligning har EC_{90} for brincidofovir blitt kalkulert til 0,31 μM , også beregnet 3 dpi ved å se på reduksjon av ekstracellulært BKPyV-genom i RPTEC (39). I samme studie ble 90% cytotoxisk konsentrasjon (CC_{90}) målt ved BrdU-inkorporering i DNA, og funnet å være 8,86 μM ($SD \pm 1,6$), noe som ga en selektivitetsindex (SI_{90}) på 28–55 (39). I en annen studie, også i et tilsvarende testsystem, ble EC_{90} for CDV funnet å være 143 μM (13). Denne dosen ga 36% reduksjon i cellereplikasjon og 23% reduksjon i metabolisme (13). Dette betyr at EC_{90} for CDV ser ut til å være mer celledskadelig enn EC_{90} for brincidofovir og ODBG-CDV. ODBG-CDV ser ut til å ha EC_{90} som ligger på rundt 1/3 av EC_{90} for brincidofovir. På grunn av betydelige konfidensintervall i SI_{90} -beregningene våre, er det vanskelig å vurdere selektiviteten til medikamentene opp mot hverandre. Reduksjonen i RPTECs metabolisme som ser ut til å være lik ved ODBG-CDVs og brincidofovirs EC_{90} , men vi har ikke observert den reduksjonen i celleindeks og 25% reduksjon i proliferasjon som ble rapportert for brincidofovir. Vi har i våre undersøkelser ikke målt cytotoxisk konsentrasjon (CC_{90}) på samme måte som ble brukt for brincidofovir, men basert på fasekontrastmikroskopi kan en anta at minst 90% av cellene ville vært cytotoxisk påvirket av 8,86 μM ODBG-CDV slik det ble rapportert for brincidofovir. Vi

har dessuten benyttet ATP-kvantifisering for å vurdere cytotoxicitet, noe som er en svært sensitiv metode for å vurdere celledød, og som gjør at vi får relativt lav selektivitetsindeks. Oppsummert betyr dette at ODBG-CDV antageligvis har en mer potent antiviral effekt mot BKPyV enn både CDV og brincidofovir. Cytostatisk og cytotoxic effekt er muligens mindre ved EC₉₀ for ODBG-CDV, noe som kan bety at ODBG-CDV har en mer selektiv antiviral effekt enn brincidofovir.

Forsøkene våre viser at det spesielt er sent proteinuttrykk og produksjon av virus som påvirkes av ODBG-CDV, noe som også er vist i tidligere studier hvor CDV og CDV-analoger har blitt brukt mot BKPyV-replikasjon (39). Uttrykk av det tidlige proteinet LTag er tilsynelatende nokså upåvirket av ODBG-CDV, til og med over 1,0 µM, noe som vises både på immunfluorescensfarging og western blott. Det skyldes sannsynligvis at LTag-uttrykk i hovedsak skjer før viral DNA-replikasjon.

Den virale hemmingen ved lave ODBG-CDV-konsentrasjoner ser ikke ut til å komme kun av en cytostatisk effekt på vertscellene. Resultatene viser at ODBG-CDV-konsentrasjoner på 0,5 µM og høyere har både cytostatisk og cytotoxic effekter, noe som reflekteres både i xCelligenceanalysene, ATP-målinger og ved mikroskopi. Celler behandlet med 0,1 µM viser derimot få eller ingen tegn på negativ påvirkning. Dette gjenspeiles i like xCelligence-kurver og ingen signifikante forskjeller i ATP-konsentrasjoner. Konsentrasjoner over 0,5 µM viste betydelige cytopatiske og cytotoxic effekter, noe vi så både ved lysmikroskopi, xCelligence og ATP-målinger. Dette vil føre til svært lav virusproduksjon i seg selv.

CDV og ODBG-CDV begge er nukleosidanaloger, og virkningsmekanismen er via påvirkning av DNA polymerase. BKPyV benytter seg av human DNA polymerase, og man går ut i fra at det er påvirkning på vertscellenes DNA-polymerase som er årsak til både antiviral effekt og cytostatisk effekt. Likevel ser vi at mengden frigitt viralt DNA, det meste sannsynligvis i form av viruspartikler, påvirkes mer enn hva man kunne forvente ut i fra en ren cytostatisk effekt. Det ser derfor ut til å være en form for selektivitet i effekten. Ved ODBG-CDV-konsentrasjoner på 0,1 µM ser vi at det kun er en liten reduksjon i uttrykk av virusproteiner, selv om mengden ekstracellulært viralt DNA reduseres med nesten 90%. Dette gjør at man kan mistenke enda en virkningsmekanisme, for eksempel at ODBG-CDV inkorporeres i viralt DNA, at dette forstyrrer pakkingen av DNA, og/eller frigjøringen av viruspartikler ut i supernatant. Dette skulle tilsi at mengden intracellulært BKPyV-DNA påvirkes mindre enn den ekstracellulære mengden som vi har undersøkt i disse forsøkene. For å undersøke dette ville man måttet gå videre med intracellulær kvantifisering av BKPyV-DNA.

Det er mange forhold som kan ha bidratt til å endre resultatene vi har fått, og også mange undersøkelser jeg mener man kunne ha gått videre med for å kontrollere resultatene. Det kan tenkes at en medvirkende faktor til den bratte økningen i cytotoxiske effekter ved økende ODBG-CDV-konsentrasjoner er fordampning fra brønnene. I en inkubator på 37 °C vil det i løpet av 3 dager skje en viss fordampning, noe som vil øke konsentrasjonen av ODBG-CDV, en effekt som vil være sterkere jo høyere utgangskonsentrasjonen er, noe som vil gi overvurdering av både antivirale og toksiske effekter. Ser man på celleindeks-kurven, ser man dog at påvirkningen på cellene med 10 og 1 µM ODBG-CDV er umiddelbar.

Det er ikke endelig avklart om BKPyV spres ved lysering av vertscellen eller ikke. Det har tidligere blitt kalkulert at for å opprettholde jevne mengder BKPyV i plasma- og urin på henholdsvis 5×10^4 gEq/mL og 10^8 gEq/mL, må tapet av celler fra allograftnyren være på $\sim 6 \times 10^7$ celler per dag (34). Våre funn viser ikke noe som tilsier at et så stort antall celler må dø for at det skal kunne frigjøres så mye virus. Vi har undersøkt ubehandlet, BKPyV-infisert RPTEC, og selv om det 3 dpi var blitt produsert $\sim 2 \times 10^{10}$ BKPyV gEq/mL, så vi ingen tegn til celledød.

Fra 3 dager etter behandling, ser man en avflatende fasong på celleindeks-kurvene for celler behandlet med kun buffer eller med 0,1 µM ODBG-CDV. Vi forsøkte å erstatte vekstmediumet hver 24. time, uten at dette endret denne trenden. Det er derfor mindre sannsynlig at avflatningen skyldes at vekstmediumet er brukt opp eller fordampning fra brønnene, og mer sannsynlig at cellene har vokst til konfluens.

Et interessant funn er at celleindeks i gjentagende forsøk er høyere for celler som har mottatt 0,1 µM ODBG-CDV enn for de cellene som har fått kun buffer. En mulig årsak til dette er at tilsetningen av ekstra nukleosider, i tillegg til de mange ikke-fungerende analogene i medikamentet, har en proliferasjonsstimulerende effekt på cellene. En annen mulig forklaring er at stresset ved at det blitt tilsatt en toksisk substans fører til at cellene stimuleres til å vokse, binde seg sterkere til underlaget og lignende.

I dette forsøket er det ikke kontrollert for eventuelle effekter av metanolbufferen alene på infiserte celler og virusreplikasjon. Det kan tenkes at en tilsetning av denne bufferen gir en viss cytostatisk effekt som alene vil kunne redusere virusproduksjonen. Ideelt sett kunne man ha supplementert med en gruppe infiserte celler som kun ble tilsatt vekstmedium. Likevel ser vi at ODBG-CDV i kombinasjon med denne bufferen har en svært annerledes effekt enn bufferen alene.

Vi har heller ikke utført viabilitetsassay hvor effekten av ODBG-CDV undersøkes på både infiserte og uinfiserte celler. Tidligere forsøk har vist at metabolisme og proliferasjon hos infisert RPTEC i større grad hemmes av CDV enn hos uinfiserte celler (13).

Et forhold som ikke er undersøkt i disse forsøkene er hvordan frigjøringen av infeksiosøst virus påvirkes av behandling med ODBG-CDV. Vi har undersøkt mengden nydannet BKPyV-DNA i supernatant. Det vi ikke har undersøkt er om virus i denne supernatanten har evnen til å infisere nye celler, og om denne evnen kan reduseres ved ODBG-CDV-behandling. Det vi derimot har sett i denne studien, er man finner mer BKPyV-DNA jo lengre tid infeksjonen har fått gå, og vi ser ved immunfluorescensfarging flere infiserte celler 3 dpi sammenlignet med 2 dpi også etter behandling med 0,1 μ M ODBG-CDV. Dette kan tyde på at nydannede virus er infeksiose.

En annen interessant videreføring hadde vært å undersøke om behandling både før og etter infeksjon gir bedre effekt enn kun behandling etter infeksjon. PyVAN rammer i all hovedsak nyretransplanterte pasienter, og det er i klinisk praksis mulig å behandle disse pasientene profylaktisk for PyVAN hvis dette viser seg å øke effekten. Effekten av å behandle primært humant urotel og RPTEC med brincidofovir 24 timer før og etter BKPyV-infeksjon har vist seg å være mye mer effektivt enn behandling kun før eller kun etter infeksjon (38, 39). Forbehandling av RPTEC med CDV 2 timer før og etter BKPyV-infeksjon har ikke vist noen signifikant større effekt sammenlignet med behandling kun 2 timer etter infeksjon (13).

En optimal behandling av polyomavirusinfeksjoner baserer seg neppe på nukleosidanaloger som har som hensikt å hemme DNA polymerase, all den tid polyomavirus' genom ikke koder for dette proteinet og den ønskede effekten da – i hvert fall delvis – må komme av en påvirkning på vertscellene. Man kan se for seg at det i fremtiden vil være mulig å lage et medikament som selektivt hemmer LTag, noe som kanskje vil kunne ha en mye mer selektiv antiviral effekt på polyomavirus.

CDV benyttes allerede i dag i en viss utstrekning mot PyVAN (4, 37). In vitro-forsøk på BKPyV i RPTEC viser at ved EC₉₀, gir brincidofovir mindre påvirkning av cellene enn CDV (13, 39). Resultatene vi har presentert her viser at ODBG-CDV muligens gir mindre cellepåvirkning enn brincidofovir ved EC₉₀. I tillegg gjør lipidkonjugeringen at ODBG-CDV i motsetning til CDV kan administreres peroralt og at CDVs nefrotoksisitet unngås. Dette gjør at ODBG-CDV potensielt kan være en bedre PyVAN-behandling enn CDV. ODBG-CDV kan være en kandidat for videre forskning og på sikt kanskje utprøves i mennesker som behandling mot BKPyV-infeksjoner som PyVAN.

6 Konklusjon

Dette arbeidet viser at cidofovirderivatet ODBG-CDV hemmer frigjøring av nytt BKPyV-DNA i et dose-responsforhold *in vitro* i primære humane nyretubuliceller og at uttrykket av sene proteiner blir kraftig redusert fra og med ODBG-CDV-konsentrasjoner på 0,5 μM . EC_{90} for frigjøring av nytt virus-DNA ble kalkulert til å være 0,11 μM (95% KI: 0,05–0,18). Denne konsentrasjonen ga i våre forsøk lite påvirkning på cellene med 12% reduksjon i metabolisme og ingen endring i viabilitet ved impedansmålinger. ODBG-CDV kan være en kandidat for videre forskning på en behandling mot PyVAN.

7 Referansliste

1. Sylvia D. Gardner AMF, Dulcie V. Coleman, B. Humne. New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *The Lancet*. 1971;1253 - 7.
2. Hirsch HH, Randhawa P, Practice ASTIDCo. BK polyomavirus in solid organ transplantation. *Am J Transplant*. 2013;13 Suppl 4:179-88.
3. Ajit P Limaye DCB. Ureteral stenosis due to BK virus infection among kidney transplant recipients UpToDate2016 [cited 2017 25.05.17]. Available from: https://www.uptodate.com/contents/ureteral-stenosis-due-to-bk-virus-infection-among-kidney-transplant-recipients?source=see_link.
4. Johnston O, Jaswal D, Gill JS, Doucette S, Fergusson DA, Knoll GA. Treatment of polyomavirus infection in kidney transplant recipients: a systematic review. *Transplantation*. 2010;89(9):1057-70.
5. James A. DeCaprio MJI, Eugene O. Major. *Fields Virology Sixth Edition*. In: David M. Knipe PMH, editor. *Fields Virology*. 2. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 1633-61.
6. Rinaldo CH TG, Sharma BN. The human polyomavirus BK (BKPyV): virological background and clinical implications. *APMIS*. 2013;121(8):728-45.
7. Egli A, Infanti L, Dumoulin A, Buser A, Samaridis J, Stebler C, et al. Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors. *J Infect Dis*. 2009;199(6):837-46.
8. Henriksen S, Mittelholzer C, Gosert R, Hirsch HH, Rinaldo CH. Human BK Polyomavirus Plasmid pBKV (34-2) (Dunlop) Contains Mutations Not Found in the Originally Published Sequences. *Genome Announc*. 2015;3(2).
9. Olsen GH, Hirsch HH, Rinaldo CH. Functional analysis of polyomavirus BK non-coding control region quasispecies from kidney transplant recipients. *J Med Virol*. 2009;81(11):1959-67.
10. Low JA, Magnuson B, Tsai B, Imperiale MJ. Identification of gangliosides GD1b and GT1b as receptors for BK virus. *J Virol*. 2006;80(3):1361-6.
11. Neu U, Allen SA, Blaum BS, Liu Y, Frank M, Palma AS, et al. A structure-guided mutation in the major capsid protein retargets BK polyomavirus. *PLoS Pathog*. 2013;9(10):e1003688.
12. Dugan AS, Eash S, Atwood WJ. An N-linked glycoprotein with alpha(2,3)-linked sialic acid is a receptor for BK virus. *J Virol*. 2005;79(22):14442-5.
13. Bernhoff E, Gutteberg TJ, Sandvik K, Hirsch HH, Rinaldo CH. Cidofovir inhibits polyomavirus BK replication in human renal tubular cells downstream of viral early gene expression. *Am J Transplant*. 2008;8(7):1413-22.
14. Hirsch HH. BK Virus: Opportunity Makes a Pathogen. *Clin Infect Dis*. 2005;41(3):354-60.
15. Gerits N, Moens U. Agnoprotein of mammalian polyomaviruses. *Virology*. 2012;432(2):316-26.
16. Henriksen S, Hansen T, Bruun JA, Rinaldo CH. The Presumed Polyomavirus Viroprotein VP4 of Simian Virus 40 or Human BK Polyomavirus Is Not Required for Viral Progeny Release. *J Virol*. 2016;90(22):10398-413.
17. ICTV Master Species List 2016 v1.1 [cited 2017 09.05.17]. Available from: <https://talk.ictvonline.org/files/master-species-lists/m/msl/6776>.
18. Padgett BL, Walker DL, ZuRhein GM, Eckroade RJ, Dessel BH. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet*. 1971;1(7712):1257-60.

19. DeCaprio JA, Garcea RL. A cornucopia of human polyomaviruses. *Nat Rev Microbiol.* 2013;11(4):264-76.
20. Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science.* 2008;319(5866):1096-100.
21. van der Meijden E, Horvath B, Nijland M, de Vries K, Racz EK, Diercks GF, et al. Primary Polyomavirus Infection, Not Reactivation, as the Cause of Trichodysplasia Spinulosa in Immunocompromised Patients. *J Infect Dis.* 2017;215(7):1080-4.
22. Hirsch HH, Steiger J. Polyomavirus BK. *Lancet Infect Dis.* 2003;3(10):611-23.
23. Knowles WA, Pipkin P, Andrews N, Vyse A, Minor P, Brown DW, et al. Population-based study of antibody to the human polyomaviruses BKV and JCV and the simian polyomavirus SV40. *J Med Virol.* 2003;71(1):115-23.
24. Goudsmit J, Wertheim-van Dillen P, van Strien A, van der Noordaa J. The role of BK virus in acute respiratory tract disease and the presence of BKV DNA in tonsils. *J Med Virol.* 1982;10(2):91-9.
25. Knowles WA. The Epidemiology of BK Virus and the Occurrence of Antigenic and Genomic Subtypes. 2001 [cited 10. mai 2017]. In: *Human Polyomaviruses: Molecular and Clinical Perspectives* [Internet]. Wiley-Liss, Inc. , [cited 10. mai 2017]; [527-59].
26. Trand Flægstad TT, Bjørn-Erik Kristiansen. Age-dependent prevalence of BK virus IgG and IgM antibodies measured by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). *J Hyg (London).* 1986.
27. Knight RJ, Gaber LW, Patel SJ, DeVos JM, Moore LW, Gaber AO. Screening for BK Viremia Reduces But Does Not Eliminate the Risk of BK Nephropathy. *Transplantation.* 2013;96(7):E51-E.
28. Hirsch HH, Knowles W, Dickenmann M, Passweg J, Klimkait T, Mihatsch MJ, et al. Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients. *N Engl J Med.* 2002;347(7):488-96.
29. Hirsch HH, Brennan DC, Drachenberg CB, Ginevri F, Gordon J, Limaye AP, et al. Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analyses and recommendations. *Transplantation.* 2005;79(10):1277-86.
30. Ramos E, Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Hamze O, Fink JC, Klassen DK, et al. Clinical course of polyoma virus nephropathy in 67 renal transplant patients. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(8):2145-51.
31. Parasuraman R, Abouljoud M, Jacobsen G, Reddy G, Koffron A, Venkat KK. Increasing trend in infection-related death-censored graft failure in renal transplantation. *Transplantation.* 2011;91(1):94-9.
32. Leivestad T. ANNUAL REPORT 2015 The Norwegian Renal Registry. <http://www.nephro.no/registry.html>; 2016.
33. Brennan DC, Agha I, Bohl DL, Schnitzler MA, Hardinger KL, Lockwood M, et al. Incidence of BK with tacrolimus versus cyclosporine and impact of preemptive immunosuppression reduction. *Am J Transplant.* 2005;5(3):582-94.
34. Funk GA, Gosert R, Comoli P, Ginevri F, Hirsch HH. Polyomavirus BK replication dynamics in vivo and in silico to predict cytopathology and viral clearance in kidney transplants. *Am J Transplant.* 2008;8(11):2368-77.
35. Norsk legemiddelhåndbok: Cidofovir [cited 2017 22.05.17]. Available from: <http://legemiddelhandboka.no/Legemidler/34082?expand=1>.
36. Cihlar T, Ho ES, Lin DC, Mulato AS. Human renal organic anion transporter 1 (hOAT1) and its role in the nephrotoxicity of antiviral nucleotide analogs. *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids.* 2001;20(4-7):641-8.

37. Kuten SA, Patel SJ, Knight RJ, Gaber LW, DeVos JM, Gaber AO. Observations on the use of cidofovir for BK virus infection in renal transplantation. *Transpl Infect Dis.* 2014;16(6):975-83.
38. Tylden GD, Hirsch HH, Rinaldo CH. Brincidofovir (CMX001) inhibits BK polyomavirus replication in primary human urothelial cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(6):3306-16.
39. Rinaldo CH, Gosert R, Bernhoff E, Finstad S, Hirsch HH. 1-O-hexadecyloxypropyl cidofovir (CMX001) effectively inhibits polyomavirus BK replication in primary human renal tubular epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(11):4714-22.
40. Hostetler KY, Beadle JR, Trahan J, Aldern KA, Owens G, Schriewer J, et al. Oral 1-O-octadecyl-2-O-benzyl-sn-glycero-3-cidofovir targets the lung and is effective against a lethal respiratory challenge with ectromelia virus in mice. *Antiviral Res.* 2007;73(3):212-8.
41. Buller RM, Owens G, Schriewer J, Melman L, Beadle JR, Hostetler KY. Efficacy of oral active ether lipid analogs of cidofovir in a lethal mousepox model. *Virology.* 2004;318(2):474-81.
42. Williams-Aziz SL, Hartline CB, Harden EA, Daily SL, Prichard MN, Kushner NL, et al. Comparative activities of lipid esters of cidofovir and cyclic cidofovir against replication of herpesviruses in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(9):3724-33.
43. Rinaldo CH, Traavik T, Hey A. The agnogene of the human polyomavirus BK is expressed. *J Virol.* 1998;72(7):6233-6.
44. Rinaldo CH, Myhre MR, Alstad H, Nilssen O, Traavik T. Human polyomavirus BK (BKV) transiently transforms and persistently infects cultured osteosarcoma cells. *Virus Res.* 2003;93(2):181-7.
45. Hey AW, Johnsen JI, Johansen B, Traavik T. A two fusion partner system for raising antibodies against small immunogens expressed in bacteria. *J Immunol Methods.* 1994;173(2):149-56.

Figurliste

Figur 1: Effekt av økende ODBG-CDV-konsentrasjoner på cellemorfologi 0 – 3 dager etter infeksjon og behandling.....	17
Figur 2: ODBG-CDVs effekt på adhesjon og proliferasjon hos uinfisert RPTEC.....	18
Figur 3: Innvirkningen av ODBG-CDV på cellemetabolisme.....	20
Figur 4: Ekstracellulær BKPyV-DNA-mengde 3 dpi etter ODBG-CDV behandling.....	22
Figur 5: Effekt av ODBG-CDV på tidlig og sent BKPyV-proteinuttrykk i RPTEC, bedømt med immunfluorescensmikroskopi.....	24
Figur 6: ODBG-CDVs effekt på BKPyV-proteinuttrykk, bedømt med konfokalmikroskopi.....	25
Figur 7: ODBG-CDVs effekt på tidlige og sene BKPyV-proteiner, tatt med konfokalmikroskop og zoomet.....	26
Figur 8: Kvantifisering av ODBG-CDVs effekt på viralt proteinuttrykk bedømt med western blott.....	28
Figur 9: Dose-responskurver for ODBG-CDV i RPTEC 3 dpi.....	30

Tabelliste:

Tabell 1: Seriefortynning av ODBG-CDV.....	10
Tabell 2: Oversikt over primærantistoffer brukt til immunfluorescens og western blot.....	13
Tabell 3: Beregning av 50 og 90% cytotoxisk og effektiv konsentrasjon, 3 dpi.....	30

Vedlegg:

- Gradevurderinger:
 - “Observations on the use of cidofovir for BK virus infection in renal transplantation”
 - “Screening for BK viremia reduces but does not eliminate the risk of BK Nephropathy: A single-center retrospective analysis”
 - “Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors”
 - “Cidofovir inhibits polyomavirus BK replication in human renal tubular cells downstream of viral early gene expression”
 - “Polyomavirus BK replication dynamics *in vivo* and *in silico* to predict cytopathology and viral clearance in kidney transplants”
 - “Polyomavirus BK replication dynamics *in vivo* and *in silico* to predict cytopathology and viral clearance in kidney transplants”
 - “1-O-Hexadexloxypropyl Cidofovir (CMX001) effectively inhibits polyomavirus BK replication in primary human renal tubular epithelial cells”

Observations on the use of cidofovir for BK virus infection in renal transplantation			GRADE
			Dokumentasjon III
			Anbefaling C
Formål	Materiale og metode	Resultater	Diskusjon/kommentarer
Karakterisere og evaluere bruken og effekten av cidofovir på BKPyV-clearance, graftutfall og bivirkninger.	<p>Studiedesign: Retrospektiv single-center analyse.</p> <p>Rekruttering deltakere: 840 pasienter nyretransplantert i perioden. 151 av disse fikk enten BK-viremi eller nefropati. 76 av disse fikk cidofovir, og alle unntatt én (døde under 3mnd etter start av oppfølgingen) ble inkludert i studien.</p>	<p>Hovedfunn</p> <p>75 pasienter fikk cidofovir i kombinasjon med reduksjon i immunsuppresjon (IS), median 13 doser. 43% hadde kortvarig (<6mnd) viremi, mens 57% hadde langvarig. Totalt ble 71% kvitt viremien (median varighet 4mnd). Høyere alder, forsinket graftfunksjon og høyere peak virus titer i blod (OR 12,8 pr log10 kopi/ml) var assosiert med langvarig viremi. Reduksjon av viremi på minst 1log₁₀ ıla første måned var assosiert med kortvarig viremi (OR 49,3 P<0,01). Pasienter med kortvarig viremi beholdt nyrefunksjon og ingen i denne gruppen mistet graftet, mens pasienter med langvarig fikk en 15% reduksjon i GFR (P= 0,02). Ingen signifikant forskjell i klarering av høygradig viremi mellom cidofovir sammen med IS-reduksjon, mot IS-reduksjon alene. Viss trend til raskere klarering med cidofovir. I snitt 5,6 (+/- 6,3)mnd fra transplantasjon til diagnose av enten viremi eller nefropati. Viremi ble i 79% av tilfellene diagnostisert hos asymptomatiske pasienter. Cidofovir ble startet opp i snitt 1,4 (+/- 2,8) mnd etter viremi-diagnose.</p>	<p>Hva diskutere forfatterne?</p> <p>I en liten subgruppeanalyse var det ikke signifikant forskjell på behandling av høygradig viremi med cidofovir+IS-reduksjon vs IS-reduksjon alene, selv om det var en viss ikke-signifikant trend. De har endret sin protokoll etter å ha sett data fra artikkelen, og gir nå kun cidofovir til pasienter med refraktær viremi.</p> <p>Grad 1 og 2 hematologiske bivirkninger (anemi, trombocytopeni, leukocytopeni) var de vanligste bivirkninger og kun én pasient måtte seponere cidofovir pga dette. Brincidofovir har en gustigere sikkerhetsprofil og blir interessant å vite effekten av. Diskuterer mange svakheter med retrospektiv tilnærning. Diskuterer det store behovet for en RCT-studie på effekten av cidofovir på BKPyV-sykdommer som PyVAN.</p> <p>Annen litteratur som styrker funnene?</p> <p>Betydelig færre i denne studien mistet graftet sitt pga PyVAN (3%) enn i andre studier. Kan muligens komme av bedre protokoller og tettere oppfølging, men kan tenkes å være fordi en så stor andel fikk cidofovir.</p> <p>Styrker: Stor pasientgruppe med tanke på at det er en sjelden sykdom og at cidofovirbehandling ikke er etablert behandling. Har i stor grad klart å holde seg til protokoll, selv om 10 pasienter fikk for sen nyrebiopsi. Alle unntatt én pasient inkludert i studien, reduserer seleksjonsbiasrisiko</p> <p>Svakhet: Retrospektiv studiedesign. Mulige manglende datapunkter, protokollavvik. Kunne muligens analysert flere variabler</p> <p>10 pasienter fikk ikke biopsi ved viremi-diagnose slik de skulle, kan ha endret nefropati-forekomsten. Ingen egentlig kontrollgruppe med høygradig viremi som ikke fikk cidofovir.</p>
Konklusjon	Alle pasientene skulle i utgangspunktet få behandling etter fastsatt protokoll.		
Mye bruk av cidofovir. Adjuvant cidofovir var assosiert med bedre nyrefunksjon.	<p>Utfall (outcome) validering: BK-viremi diagnostisert med qPCR, PyVAN diagnostisert med biopsi.</p> <p>Variabler: Varighet på BK-viremi, hematologiske parametre, nyrefunksjon, virus titer i blod og urin.</p>		
Land	Statistiske metoder		
USA	Students t-test for numeriske og kji-kvadrat-test for kategoriske data. Deretter multivariat analyse		
År, innsamling			
2007-2012			

Screening for BK viremia reduces but does not eliminate the risk of BK Nephropathy: A single-center retrospective analysis

GRADE

Dokumentasjon

III

Anbefaling

C

RJ. Knight, LW Gaber, SJ Patel, JM DeVos, LW Moore, AO Gaber, Transplantation 2013

Formål	Materiale og metode	Resultater	Diskusjon/kommentarer
Undersøke hvordan screening-protokoll, immunsuppresjon (IS), cidofovirbruk hadde fungert mot PyVAN.	Retrospektiv single-center analyse Rekruttering: 369 nyretransplanterte. 20 ikke inkludert; siden de innen de første 3mnd ble lost to follow up (11), fikk graftsvikt (5) eller døde (4). Datagrunnlag: Pasientene ble fulgt opp i median 22 (+/- 10) mnd. qPCR for BKPyV utført 1, 3, 6, 12, 18 og 24 mnd etter transplantasjon. Nyrebiopsi ved BKPyV-viremi eller kreatininstigning. Utføring: Senteret hadde en protokoll for screening og håndtering som de skulle følge. Viremi skulle føre til reduksjon av immunsuppresjon (IS). Cidofovir til alle med høy virus titer eller med PyVAN på biopsi. Viremi definert som to tester som viste >750 virale kopier/ml. Statistikk:kji-kvadrat test, univariat analyse, fishers exact test, log rank test, Kaplan Meier	Hovedfunn: 16% som hadde gjennomgått nyretransplantasjon fikk BKPyV-viremi. Av disse mistet 7% graftet sitt, noe som var verre enn i gruppen uten viremi (p<0,01). Av de som hadde viremi, hadde 21% høygradig viremi, definert som >100.000 kopier/ml. 21% av de med høygradig viremi mistet graftet sitt, mot 2% av de med lavgradig viremi (p=0,04). Median tid fra transplantasjon til viremi var 3 måneder (ICR: 1-17). 58% av de som hadde BKPyV-viremi fikk cidofovir. De som fikk BKPyV-viremi hadde signifikant dårligere GFR ved 9 og 12 måneder enn de som aldri fikk BKPyV-viremi Bifunn: 59% av de med viremi fikk utført biopsi, hvor 47% viste PyVAN. Risikofaktorer for å utvikle BKPyV-viremi var asiatisk etnisitet (OR 4,36 p=0,005), transplantat fra død donor (OR 1,96, p=0,03) og alder>60år (OR 1,97 p=0,05).	Forfatterenes diskusjon: De har vist at en stor andel av pasientene som har gjennomgått nyretransplantasjon utvikler BKPyV-viremi, og av disse mister en betydelig andel nyren sin. Til tross for at de følger internasjonale konsensusretningslinjer, oppnår de ikke samme gode graftoverlevelse som andre rapporterer om. Deres prevalens av BKPyV-viremi er på nivå med andre studier, men utkommet er altså litt dårligere. Resultatene deres er bedre enn det som ble rapportert fra før man begynte med prospektiv PCR-screening hver 3.måned i et år, så screeningen hjelper. Siden alle pasientene som fikk cidofovir også fikk IS-reduksjon, kan de ikke konkludere med cidofovirs effekt. Det er et stort behov for bedre behandling og også et stort behov for mer høykvalitetsforskning med kontrollgrupper, blinding og randomisering. Styrker: En stor studie hvor det er inkludert mange pasienter med en sjelden sykdom. Pasientene er behandlet relativt likt og etter en forhåndsdefinert protokoll. Ganske god inklusjon; få er utelatt fra studien. Ser på mange variabler; donorkarakteristika, pasientetnisitet, alder etc. Svakheter: Retrospektiv studie. Ingen kontrollgruppe som ikke får cidofovir; kun 58% av de med BKPyV-viremi fikk cidofovir, så de kunne ha analysert en kontrollgruppe. Litt ulike immunsuppresjonsregimer. Inkonsistent cidofovirbehandling, behandling var basert på biopsisvar. Kun 59% av pasientene med BKPyV-viremi fikk utført nyrebiopsi.
Konklusjon			
16% av nyretransplanterte hadde BK-viremi, av disse fikk 7% grafttap. Screening er ikke godt nok.			
Land			
USA			
År, innsamling			
2007-2010			

Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors.

Egli A, Infanti L, Dumoulin A, Buser A, Samaridis J, Stebler C, et al. The Journal of Infectious Disease. 2009.

GRADE

Dokumentasjon

III

Anbefaling

C

Formål	Materiale og metode	Resultater	Diskusjon/kommentarer
Å undersøke forekomsten av antistoffer mot BKPyV og JCPyV i en frisk befolkning, og sammenligne dette med forekomst av virus-DNA i urin og blod	<p>Studiedesign: Tverrsnittsstudie</p> <p>Rekruttering deltakere: 400 friske, påfølgende blodgivere screenet for HIV, HBV, HBC og syfilis. Rekrutterte 50 menn og 50 kvinner i hver alderskategori: 20-29, 30-39, 40-49 og 50-59.</p> <p>Datagrunnlaget: Blod- og urinprøver samlet ved vanlig blodgivning. Ingen demografiske data utenom etnisitet og alder.</p>	<p>Hovedfunn: 82% av studiepopulasjonen hadde IgG-antistoffer mot BKPyV, mens 58% hadde IgG mot JCPyV (skal i denne oppsummeringen kun fokusere på BKPyV da det er det som er relevant for min oppgave). 7% av populasjonen hadde BKPyV-DNA i urin, og ingen hadde positiv urin uten også ha IgG. Kun 1% var IgM-positive for BKPyV, alle disse også IgG-positive.</p> <p>BKPyV-seroreaktivitet faller i løpet av livet, fra 87% (20-29år) til 71% (50-59år) (p=0,006).</p> <p>Ingen hadde verken BK- eller JCPyV i plasma</p> <p>Bifunn: Seroprevalensen var lik for menn og kvinner, men IgG-nivå var signifikant høyere hos kvinner (p=0,025), mens BKPyV-viruri var signifikant hyppigere hos menn (p=0,05). Virurimengde ved viruri var lik for kjønnene.</p> <p>BKPyV-IgG-nivå signifikant høyere hos de som var negative for IgG-JCPyV-negative (p=0,012).</p> <p>80% BKPyV-serotype 1 i urin, 8% type 2, 20% type 4.</p> <p>Ingen NCCR-rearrangerer i urin, kun arketype blant 20 sekvenseringer.</p>	<p>Hva diskutere forfatterne?</p> <p>Fallet i BKPyV-IgG tyder på at det ikke skjer mye reeksponering i løpet av livet.</p> <p>Fraværet av IgM selv ved utskillelse av virus i urin tyder på at det er snakk om en persisterende eller latent infeksjon.</p> <p>Diskuterer hvordan BK- og JCPyV deler 72-81% nukleotidanalogi, noe som legger grunnlag for mulig kryssimmunitet.</p> <p>Prevalensen av BKPyV i befolkningen har vært lik siden 1991, noe som tyder på at den store økningen i insidensen av BK polyomavirus-assosiert nefropati ikke skyldes økt prevalens av viruset, men at det må skyldes forhold som endringer i immunsuppresjon.</p> <p>Annen litteratur som styrker funnene:</p> <p>Studie fra England (Knowles WA et al, J Med Virol, 2003) undersøkte 2435 blodprøver fra 1991 og fant en seroprevalens på 81%, med et fall fra 91% til 74% i løpet av livet (P<0,01).</p> <p>Styrke: Relativt stor tverrsnittsstudie som undersøker prevalens i frisk befolkning. Ikke konfundert av graviditet, sykdom eller andre kliniske/labratoriemessige avvik, slik mange andre studier på samme tema er. Studien oppgir at det var 400 påfølgende bloddonorere, noe som reduserer risikoen for seleksjonsbias.</p> <p>Svakhet: Kan tenkes å være negativt seleksjonsbias ved infeksjonssykdommer hos de som melder seg som blodgivere, men antageligvis ikke sannsynlig siden prevalensen av BKPyV er så høy. Aldersgruppene som er valgt ut (100 i hver aldersgruppe, og jevnt fordelt mellom kjønnene, alder 20-60) er ikke representativt for alderen i befolkningen, og man kan ikke konkludere med at 82% av befolkningen er seropositive. Ingen positive qPCR-serum; Kanskje vil mer sensitive analysemetoder kunne fange opp svært lave gEq/ml-nivåer.</p>
Konklusjon	Blod undersøkt med enzym immunoassay for IgG og IgM, samt qPCR for BKPyV og JCPyV. qPCR ble utført på urin. Ved positivt qPCR gjorde man sekvensering av BKPyVs VP og av NCCR på begge virus.		
IgG-prevalens for BK og JC			
Land			
Sveits			
År data innsamling			
2007-2008			

Cidofovir inhibits polyomavirus BK replication in human renal tubular cells downstream of viral early gene expression.

E. Bernhoff, T.J. Gutteberg, K. Sandvik, H.H. Hirsch, C.H. Rinaldo, Am J Transplant 2008

Dokumentasjon

IV

Anbefaling

C

Formål	Materiale og metode	Resultater	Diskusjon/kommentarer
Undersøke in vitro-effekten av cidofovir på BKPyV-infisert RPTEC, og se på hvordan RPTEC tålte behandlingen	<p>Studiedesign: Eksperimentell basalfaglig studie.</p> <p>Metode: Renale primære tubulære epitelceller (RPTEC) ble infisert med BKPyV fra Verocellesupernatant, ved multiplicity of infection rundt 1. 2 timer etter infeksjon ble virus erstattet av cidofovir i ulike konsentrasjoner.</p> <p>Ubehandlete kontrollgrupper, samt uinfiserte kontroller. DNA-syntese og ekstracellulært DNA ble kvantifisert 24, 48, 72 og 96 timer etter infeksjon. Undersøkelse av viral protein produksjon ble undersøkt ved hjelp av immunfluorescensfarging og western blott ble utført 3 dager etter infeksjon. Flere ulike viabilitetsassay.</p>	<p>Cidofovir hemmet produksjonen av nye viruspartikler med 90% ved 40mg/ml (EC₉₀). Denne dosen så ikke ut til å gi noen synlige skader ved lysmikroskop. 40mikrog/ml ga i infiserte celler redusert cellulært DNA replikasjon med 36% og redusert metabolsk aktivitet med 23%. Effekten var mindre ved samme doser på uinfiserte celler.</p> <p>Behandling 2 timer før og etter infeksjon ga ingen signifikant forskjell i ekstracellulært virus-DNA 72hpi sammenlignet med behandling kun etter infeksjon. En moderat reduksjon i ekspresjon av tidlige virusproteiner ble sett først etter 48-72 timer. Sammenlignet med ubehandlede celler, ga 40mg/ml over 99% reduksjon i ekstracellulært virus-DNA 2,3,4 dpi.</p> <p>Undersøkelse av virale proteiner på enkeltcellenivå med immunfluorescensfarging viste en liten reduksjon i LTag, men stor reduksjon i Agnoprotein ved behandling. Likevel virket noen infiserte celler å resistente mot cidofovirbehandling. Behandling over 3 døgn var bedre enn behandling over kun ett eller to døgn.</p> <p>BKPyV intra- og ekstracellulært DNA begynte å øke fra 24 timer etter infeksjon.</p>	<p>Forfatterne diskuterte at 40mikrog/ml reduserte sene proteiner og mRNA med ca 90%. Ved IF så man at LTag var mer eller mindre lik som ved ubehandlede, infiserte celler.</p> <p>Cidofovir førte til signifikant hemming av metabolisme og cellulær DNA-replikasjon, en effekt som var sterkere i infiserte enn uinfiserte celler. Dette dokumenterer betydelig toksisitet på RPTEC som ikke var synlig på mikroskopisk undersøkelse.</p> <p>Diskuterer at en del av den toksiske effekten til cidofovir antageligvis kommer av inkorporering i vertscellens DNA, noe som er rapportert ved cidfovirbehandling av andre virus som mangler DNA polymerase. CC₉₀ fra denne studien er lik CC₅₀ som er rapportert fra BKPyV i lungefibroblaster. Det diskuteres at dette nok i stor grad kan komme av aktiv transport av cidofovir inn i nyreceller.</p> <p>Det diskuteres også at 90% antageligvis vil være tilstrekkelig for å fjerne viruset, da matematiske modeller viser at virusreplikasjon minst må hemmes med 80% i minst 10 uker.</p> <p>Klinisk bruk er problematisk fordi: 1) langtidsbruk og intracellulær akkumulasjon øker risiko for nefrotoksitet. Mange celler tapes under PyVAN, og proliferasjonshastigheten må være høy. 2) immunfluorescens viser at omtrent en del av cellene var nesten helt refraktære mot cidofovir. 3) Selv i celler hvor replikasjon er undertrykket finnes fortsatt LTag, og virusreplikasjon kan kanskje gjenopptas når behandling avsluttes.</p> <p>Styrker: Svært god overførbarhet til min studie, med like metoder utført, like celler og virus. Ser både på intra og ekstracellulært virusDNA. Utfører flere ulike viabilitetsassay.</p> <p>Svakheter: Begrenset antall forsøk, ikke mange andre studier å sammenligne med, ser ikke på hvor infeksjons supernatant er.</p>
Konklusjon			
Cidofovir 40mikrog/ml hemmer BKPyV-replikasjon med 90%, men dette gir også betydelig cytotoksitet, og ikke fullstendig hemming			
Land			
UNN/Norge			
År data innsamling			
2007-2008			

Polyomavirus BK replication dynamics *in vivo* and *in silico* to predict cytopathology and viral clearance in kidney transplants.

Dokumentasjon	C
Anbefaling	III

GA Funk, R Gosert, P Comoli, F Ginevri, HH Hirsch. American Journal of Transplantation, 2008

Formål	Materiale og metode	Resultater	Diskusjon/kommentarer
<p>Å undersøke dynamikken i utviklingen av BKPyV-viremi og viruri. Forsøke å lage en modell for hvordan BKPyV reaktiveres og spres</p>	<p>Studietype: Prospektiv observasjonsstudie</p> <p>Prospektivt samlet blod- og urinprøver ved mikrobiologisk avd. Basel og pediatrik nefrologi, Genova. 223 nyretransplanterte pasienter avla 518 dagmatchede urin- og blodprøver. 31 pasienter bidro med longitudinelle prøver (>4). Totalt 177 dynamiske episoder som kunne analyseres. Kreatininprøver fra 26 pasienter. 6 pediatriske pasienter med vedvarende viremi og viruri ble prospektivt monitorert for å kunne validere resultatene. qPCR ble brukt på både blod og urin. Matematiske modeller (2-compartment modell) ble benyttet for å vurdere dynamikk mellom infisert og uinfisert epitel i nyre og blære.</p>	<p>Hovedresultater: Man må redusere BKPyV-replikasjon med >80% for å få kontroll på infeksjonen; man kunne bli kvitt viremi i løpet av 7 uker, men viruri ville da vedvare >14 uker. Reduksjon med 90% ga en mer effektiv klaring, med opphør av viremi og viruri i løpet av hhv. 3 og 10 uker.</p> <p>Matematiske modeller viste at den modellen som passer best med det kliniske bildet var: replikasjon starter i nyre, sprer seg til urotel og deretter spres til nye områder i nyren fra urotel ved vesicouretral reflux. >95% av BKPyV i urin kommer fra virusreplikasjon urotel og kun <5% fra nyretubuli. Dette ble i stor grad bekreftet ved prospektiv analyse av 6 nye pasienter. BKPyV-mengden i urin var omtrent 3000X mengden i blod (p=10⁻⁹). BKPyV har kort halveringstid i urin og blod (<12t), og forfatterne konkluderer med at dette forårsaker tap av 4E7 urotelceller og 6E7 celler fra allograftnyren per dag.</p> <p>Biresultater. Det ser ikke ut til å være en tydelig samvariasjon mellom svingninger i mengden BKPyV i blod og urin. Mengde BKPyV i urin steg jo nærmere det var til pasienten fikk virus i blod (r²=0,33, p=0,03).</p> <p>Rearrangert NCCR ble funnet oftere i blod enn i urin (54% vs 8%, p=0,0007) (basert på 26 analyser).</p>	<p>Modellen nyre->urotel<->nyre for spredning av BKPyV passer godt med de blod og urinprøvene de finner. Denne modellen krever en viss grad av vesicouretral reflux siden celle-cellespredning av BKPyV opp ureter ville tatt flere år. Beskrevet flere ganger i litteraturen at vesicouretral reflux ikke er uvanlig hos PyVAN-pasienter.</p> <p>Dette betyr at man også må behandle BKPyV-infeksjon i urotel for å klare å få kontroll på PyVAN.</p> <p>Hos noen pasienter ble det funnet svært høye virurivåer uten at pasientene hadde viremi. Dette gjør det vanskelig å predikere viremi kun basert på viruri.</p> <p>De viser dog en klar sammenheng mellom viruri og viremi, noe flere studier har vist tidligere. UrinBKPyV ca 3000X BKPyV i blod. Økning 10 i viremi gir ca økning på 100 i viruri.</p> <p>De så et slags tak, hvor det aldri ble mer enn 11 og 8 Log₁₀ BKPyV hhv. i urin og blod. Dette også beskrevet flere ganger tidligere, muligens på grunn av en begrensning i vertscellers kapasitet til produksjon.</p> <p>Kommentarer: Forfatterne har tatt utgangspunkt i lytisk spredning av BKPyV ved beregning av hvor mange nyretubuli og urotelceller pasienter med viruri må miste. Studiens resultat på antall tapte celler/dag, er over 1log høyere enn hva tidligere studier konkluderer med.</p> <p>Data er samlet prospektivt, noe som er positivt. Modellen for spredning er verifisert ved å følge et lite utvalg pasienter tettere. Antallet pasienter (223 pas, 518 prøver) i studien er relativt høyt med tanke på PyVANs lave prevalens. Dessverre er det kun 31 pasienter som har avlagt 4 blod+urinprøver eller mer. Kun 31 kreatininprøver.</p>
Konklusjon			
BKPyV spres sannsynligvis nyre->urotel<->nyre. BKPyV-replikasjon må reduseres med 80%, og helst med 90%			
Land			
Sveits & Italia			
År data innsamling	<p>Kinetiske analyser med Spearmans korrelasjonskoeffisient r².</p>		
2002-2008			

1-O-Hexadexloxypropyl Cidofovir (CMX001) effectively inhibits polyomavirus BK replication in primary human renal tubular epithelial cells.

CH Rinaldo, R Gosert, E Bernhoff, S Finstad, and HH Hirsch. Antimicrob Agents Chemotherapy, 2010

Dokumentasjon	IV
Anbefaling	C

Formål	Materiale og metode	Resultater	Diskusjon/kommentarer
Undersøke <i>in vitro</i> -effekten av CMX001 på BKPyV-infisert RPTEC, og se på hvordan RPTEC tålte behandlingen	<p>Studiedesign: Eksperimentell basalfaglig studie.</p> <p>Metode: Primære humane nyreceller (RPTEC) ble infisert med BKPyV (Dunlop), og CMX001 (brincidofovir) ble tilsatt som behandling 2 timer senere i ulike konsentrasjoner. Intra- og ekstracellulær BKPyV-DNA mengde ble kvantifisert med qPCR.</p>	<p>Hovedresultater: De titrerte seg frem til at en CMX001-konsentrasjon på 0,31µM førte til 90% reduksjon (EC₉₀) i ekstracellulær BKPyV-mengde 72 timer etter infeksjon (EC₉₀). Selektivitetsindex (SI₉₀) ble kalkulert til å være mellom 28 og 55.</p> <p>LTag (tidlig protein)-mRNA og – proteinuttrykk var uendret 24 timer etter infeksjon, men redusert med 33 og 64% hhv. 48 og 72 timer etter infeksjon.</p> <p>48 timer etter infeksjon var mengden intracellulært BKPyV redusert med 90% sammenlignet med ubehandlede celler.</p> <p>Uttrykket av sene gener (undersøkt med mRNA-kvantifisering) var redusert med ca 90% 2 og 3 dager etter infeksjon.</p> <p>Immunfluorescensmikroskopi viste viralt proteinuttrykk på enkeltcellenivå. LTag-signalet hadde sunket litt ved behandling, men ikke like mye som uttrykket av de sene proteinene agno og VP1. Noen refraktære celler selv ved med CMX001-konsentrasjoner på så mye som 2,5µM.</p>	<p>Forfatterenes kommentarer: Resultatene tyder på at CMX001 hemmer BKPyV-replikasjon på nivå med genomreplikasjon, etter at uttrykket av tidlige proteiner er gjennomført, noe som skjedde mellom 24 og 48 timer etter infeksjon.</p> <p>Ved behandling 24 timer før infeksjon oppnådde man en enda høyere inhibering av BKPyV.</p> <p>Sammenlignet med studier gjort på cidofovir hadde CMX001 raskere og mer varig antiviral effekt. CMX001 0,31µM hadde liten effekt på total cellelevetid, men reduserte vertscelleproliferasjonen med 20-30%. BKPyV-infeksjon i seg selv fører dessuten i 25% økning i proliferasjonshastighet.</p> <p>EC₉₀ mot BKPyV for CMX001 var ca 400 ganger lavere enn EC₉₀ for cidofovir.</p> <p>Andre studier har vist økt potens ved lipidkonjugater av cidofovir, slik som CMX001, men ingen har tidligere sett på denne effekten ved behandling av BKPyV i RPTEC.</p> <p>CMX001 har poteinsiale til å være både mer effektivt og mer skånsomt enn cidofovir ved behandling av PyVAN, men det trengs mer forskning.</p> <p>Fordeler: Svært god overføringsevne til min studie, like forhold, cellekulturer, metoder og analyser. Undersøker både intracellulært og ekstracellulært BKPyV-genom med qPCR. Flere ulike viabilitetsmål.</p> <p>Ulemper: In vitro-studie har selvfølgelig begrenset evne til å si om en intervensjon egner seg i klinisk praksis, noe som må vurderes i en GRADE-vurdering. Vanskelig å vite om immunfluorescensbilder er tatt av et representativt område eller et område som viser spesielt god effekt.</p>
Konklusjon	Viralt genuttrykk ble undersøkt med kvantitativ revers transkripsjons-PCR, western blot og immunfluorescensmikroskopi. Celleviabilitet, proliferasjon, metabolsk aktivitet og cellulært DNA replikasjon ble også undersøkt, ved hjelp av BrdU, xCelligence og WST-1.		
CMX001 (brincidofovir) har en EC ₉₀ på 0,31µM mot BKPyV i RPTEC. Et potensielt bedre alternativ til cidofovir.			
Land			
UNN/Norge			
År data innsamling			
2010			

2010

